



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS

**AVALIAÇÃO DO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS DE
EQUINOS ARMAZENADO EM BOLSAS PLÁSTICAS
CONTENDO AS SOLUÇÕES CPDA-1 E CPD/SAG-M**

CRISTIANA MORAIS COSTA

Salvador - BA
2018

CRISTIANA MORAIS COSTA

**AVALIAÇÃO DO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS DE
EQUINOS ARMAZENADO EM BOLSAS PLÁSTICAS
CONTENDO AS SOLUÇÕES CPDA-1 E CPD/SAG-M**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciência nos Trópicos.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Maria Consuelo Caribé Ayres

Co-Orientadora: Dra. Ludmila Rodrigues Moroz

Salvador - BA
2018

AVALIAÇÃO DO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS DE EQUINOS ARMAZENADO EM BOLSAS PLÁSTICAS CONTENDO AS SOLUÇÕES CPDA-1 E CPD/SAG-M

CRISTIANA MORAIS COSTA

Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Salvador, em ____ de _____ de 2018.

Comissão Examinadora:

Dr^a Stella Maria Barrouin Melo
Universidade Federal da Bahia/UFBA

Dr^a Iris Daniela Santos Meneses
Universidade Federal da Bahia/UFBA

Dr. Alexandre Dias Munhoz
Universidade Estadual de Santa Cruz/UESC

Dr^a. Maria Consuêlo Caribé Ayres
Universidade Federal da Bahia/ UFBA
Orientadora

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Cristiana Moraes Costa – Nascida em 26 de novembro de 1990, na cidade de Salvador - BA. Iniciou o curso de Graduação em Medicina Veterinária, na União Metropolitana de Educação e Cultura, UNIME-Lauro de Freitas, em 2009, concluindo em 2014. Em 2014 ingressou na Residência Médica Veterinária com especialização na área de Patologia Clínica Veterinária, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP-Botucatu, São Paulo, sob a orientação do Professor Dr. Raimundo Souza Lopes e co-orientação da Professora Dra. Regina Kiomi Takahira, concluindo em 2016. Atualmente realiza Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos, na Universidade Federal da Bahia, UFBA-Salvador, sob a orientação da Professora Dra. Maria Consuelo Caribé Ayres e co-orientação da Dra. Ludmila Rodrigues Moroz.

“Tudo que você sabe, não pertence a você. Não é a sua propriedade.
O conhecimento não faz mais do que passar através de você.
Um dos nossos motivos de estar sobre a Terra é compartilhar isso”.

Daniel Pennacchioni

Dedico essa dissertação a todos os professores que passaram por minha vida.

AGRADECIMENTOS

À orientadora prof^a. Dr^a. Maria Consuelo Caribé Ayres, por apoiar a idéia do projeto e a co-orientadora Dr^a. Ludmila Rodrigues Moroz por ajudar com a sua experiência a executá-lo. Ambas me guiaram na interpretação dos resultados e a elaborar a dissertação, foi um trabalho árduo, mas produtivo em aprendizado que levarei por toda a vida profissional.

Ao Esquadrão da Polícia Militar da Bahia e ao Major Wilson Gustavo, por disponibilizar os equinos da cavalaria para a execução do projeto.

Ao Dr. Domingos Cachineiro Rodrigues Dias, por realizar os exames clínicos, contribuindo com a seleção dos animais.

Ao Prof. Thadeu Silva, pelos dados estatísticos que tornaram o meu trabalho singular.

Ao MSc. Evandro Neto pela mensuração do potássio (sei que não foi fácil) e pela microbiologia.

Ao Sr. Silvio Cerqueira por me ensinar pacientemente a manipular com o equipamento bioquímico e por me apresentar Fernando Maia, da empresa MedSee, que me emprestou alguns equipamentos e ferramentas essenciais para a execução do trabalho.

Aos estagiários do Laboratório de Pesquisa de Hematologia e Bioquímica Clínica (EMEVZ) e colegas da pós-graduação da UFBA que me apoiaram, acreditaram e deram o suporte na execução e apresentação do trabalho.

A Iuri Bernard que, além de contribuir com as tabelas e formatação do trabalho, vem acompanhando a minha jornada desde a graduação, sempre participante na plateia.

A banca examinadora da pré-defesa (Dr^a Stella Maria Barrouin Melo, Dr^a. Elisângela Vitória Adorno e Dr^a Iris Daniela Santos Meneses) pelas observações e críticas pertinentes que acrescentaram em conteúdo esta dissertação.

Aos meus pais pelo eterno incentivo, amparo e amor.

E todas as pessoas que me ajudaram com palavras sábias de conselho e conforto.

A todos vocês a minha gratidão.

RESUMO

COSTA, C. **Avaliação do concentrado de hemácias de equinos armazenado em bolsas plásticas contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M.** 2018.87p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2018.

A medicina transfusional veterinária tem evoluído muito nas últimas décadas, acompanhando os avanços presentes na medicina humana como, por exemplo, a utilização de novas soluções conservantes contidas nas bolsas de sangue. Durante o período de armazenamento das bolsas de sangue, ocorrem alterações hematológicas, hemogasométricas e bioquímicas nos eritrócitos, conhecidas como lesões de armazenamento. Porém, poucos estudos abordaram, em equinos, sobre o protocolo de armazenamento de bolsas de sangue em diferentes soluções de conservação. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações hematológicas, hemogasométricas e bioquímicas ocorridas durante o armazenamento de concentrado de hemácias de equinos em bolsas plásticas contendo Citrato, Fosfato, Dextrose e Adenina (CPDA-1) e Citrato, Fosfato, Dextrose, Salina, Adenina, Glicose e Manitol (CPD/SAG-M). Foram avaliadas 17 bolsas de concentrado de hemácias (8 CPDA-1 e 9 CPD/SAG-M), e as análises laboratoriais foram realizadas semanalmente totalizando 35 dias. As avaliações hematológicas realizadas foram: a contagem total de hemácias, o volume corpuscular médio (VCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), o volume globular (VG), a hemoglobina livre e cálculo do grau de hemólise. As avaliações hemogasométricas foram: o potencial hidrogeniônico (pH), a pressão parcial de oxigênio (PO₂), a pressão de dióxido de carbono (PCO₂), a saturação de oxigênio (SpO₂) e o bicarbonato (HCO₃⁻). As avaliações bioquímicas foram: as concentrações de glicose, lactato e potássio (K⁺). Os dados foram submetidos à análise dos valores médios de cada parâmetro e comparados pelo teste Tukey-Kramer e alguns parâmetros foram submetidos às mudanças proporcionais em valores percentuais e ao teste de correlação de Pearson. A significância foi declarada quando P<0,05. As análises deste estudo demonstram que os eritrócitos dos equinos se comportam de forma distinta entre as soluções conservadoras. Com base nas principais alterações que ocorreram ao longo do período de armazenamento, sendo estas o grau de hemólise, pH, as concentrações de lactato e potássio extracelular, concluiu-se que os dois tipos de bolsas de sangue estudadas apresentaram viabilidade para uso, quando armazenadas por 35 dias, porém as bolsas CPDA-1 apresentaram menos lesões de armazenamento.

Palavras-Chaves: *Lesões de armazenamento, hemocomponentes, equinos.*

ABSTRACT

COSTA, C. **Evaluation of equine red blood cells stored in plastic bags containing solutions CPDA-1 e CPD/SAG-M.** 2018. 87p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2018.

Veterinary transfusion medicine has evolved a lot in recent decades, accompanying advances in human medicine such as the use of new preservative solutions contained in blood bags. During the storage period of the blood bags, hematological, hemogasometric and biochemical changes occur in erythrocytes, known as storage lesions. However, few studies have addressed, in equines, the protocol for storing blood bags in different storage solutions. The objective of this study was to evaluate hematological, hemogasometric and biochemical alterations during storage of equine red blood cells in plastic bags containing Citrate, Phosphate, Dextrose and Adenine (CPDA-1) and Citrate, Phosphate, Dextrose, Saline, Adenine, Glucose and Mannitol (CPD / SAG-M). 17 bags of red blood cells (8 CPDA-1 and 9 CPD / SAG-M) were evaluated, and laboratory tests were performed weekly for a total of 35 days. The hematological evaluations were: the total red cell count, medium corpuscular volume (MCV), medium corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), packed cell volume (PCV), free hemoglobin, and calculation of the degree of hemolysis. The hemogasometric evaluations were: the hydrogen ionic potential (pH), oxygen partial pressure (PO₂), carbon dioxide pressure (PCO₂), oxygen saturation (SpO₂) and bicarbonate (HCO₃⁻). The biochemical evaluations were: the concentrations of glucose, lactate and potassium (K⁺). The data were submitted to the analysis of the mean values of each parameter and compared by the Tukey-Kramer test and some parameters were submitted to the proportional changes in percentage values and to the Pearson correlation test. The significance was stated when P < 0.05. The analyzes in this study demonstrate that equine erythrocytes behave differently between conservative solutions. Based on the main changes that occurred during the storage period, such as the degree of hemolysis, pH, lactate levels and extracellular potassium, it was concluded that the two types of blood bags studied were viable for use when stored for 35 days, but the CPDA-1 bags presented fewer changes regarding storage lesions.

Keywords: *Storage lesions, blood components, equines.*

LISTA DE FIGURAS

| | | Página |
|-----------|---|--------|
| Figura 1 | Desenho esquemático do transporte de dióxido de carbono (CO ₂) no sangue. | 24 |
| Figura 2 | Figura ilustrativa da composição da membrana celular. | 25 |
| Figura 3 | Figura ilustrativa da estrutura da molécula de hemoglobina mostrando os dois pares de cadeias de polipeptídeo. | 27 |
| Figura 4 | Desenho esquemático do conjunto de bolsas plásticas de coleta de sangue: bolsa primária e satélite. | 30 |
| Figura 5 | Fotografia ilustrativa de um equino do Esquadrão da Polícia Montada da Bahia em baia individual. | 43 |
| Figura 6 | Fotografias ilustrativas da homogeneização (setas brancas indicando o movimento circular) realizada nas bolsas de concentrado de hemácias de equinos antes de obter a alíquota das mesmas (A) e a homogeneização retrógrada na tubulação (seta preta), com auxílio de um alicate de ordenha para bolsa de sangue (B). | 46 |
| Figura 7 | Fotografias ilustrativas do corte distal à bolsa de sangue (seta preta), para lavagem da tubulação com o sangue homogeneizado (C) e demonstração da utilização da máquina seladora (D). Fonte: Arquivo pessoal. | 47 |
| Figura 8 | Fotografias demonstrativas das alíquotas obtidas da tubulação da bolsa de sangue após a selagem (Foto E). A porção mais distal é descartada por haver contato direto com o ar (seta). Duas alíquotas destacadas da tubulação da bolsa de sangue (Foto F). | 47 |
| Figura 9 | Fotografias ilustrativas da manipulação da alíquota destacada da tubulação da bolsa de sangue (seta branca), sem contato direto com o ar (Foto G). Uma extremidade da alíquota era cortada no momento de introduzir a amostra (seta branca) no hemogasômetro (Foto H). | 48 |
| Figura 10 | Representação gráfica da variação no número de hemácias por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 52 |
| Figura 11 | Representação gráfica da variação no volume corpuscular médio (VCM) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 53 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 12 | Representação gráfica da variação na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 54 |
| Figura 13 | Representação gráfica da variação do volume globular (VG) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 55 |
| Figura 14 | Representação gráfica da variação da hemoglobina livre por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 56 |
| Figura 15 | Representação gráfica da variação do grau de hemólise por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 57 |
| Figura 16 | Representação gráfica da variação do potencial hidrogeniônico (pH) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 59 |
| Figura 17 | Representação gráfica da variação da pressão parcial de oxigênio (PO_2) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 60 |
| Figura 18 | Representação gráfica da variação da pressão de dióxido de carbono (PCO_2) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 61 |
| Figura 19 | Representação gráfica da variação da saturação de oxigênio (SpO_2) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 62 |
| Figura 20 | Representação gráfica da variação do bicarbonato (HCO_3^-) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 63 |
| Figura 21 | Representação gráfica da variação da concentração de glicose por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 65 |
| Figura 22 | Representação gráfica da variação da concentração de lactato por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 66 |
| Figura 23 | Representação gráfica da variação da concentração de potássio por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 67 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabela 1 Médias e desvios padrões obtidas das análises hematológicas durante o tempo de armazenamento (dias) referente às bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M de concentrado de hemácias de equinos. | 51 |
| Tabela 2 Médias e desvio padrão seguida por letras diferentes obtidas das análises hemogasométricas semanais referentes às bolsas CPDA-1 e CPDA/SAG-M de concentrado de hemácias de equinos. | 58 |
| Tabela 3 Médias e desvios padrões seguida por letras diferentes obtidas das análises bioquímicas semanais referentes às bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M de concentrado de hemácias de equinos. | 64 |
| Tabela 4 Modificações percentuais (média \pm desvio padrão) ao longo do tempo de armazenamento, dos parâmetros volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume globular (VG), potencial hidrogeniônico (Ph), pressão parcial de oxigênio (PO ₂), pressão de dióxido de carbono (PCO ₂), saturação de oxigênio (SpO ₂), bicarbonato (HCO ₃ ⁻), glicose e lactato, nas amostras das bolsas de sangue contendo as solução CPDA-1 e CPD/SAG-M. | 68 |
| Tabela 5 Coeficiente de correlação de Pearson entre os parâmetros hemoglobina livre (Hg livre), grau de hemólise (Hemólise), potencial hidrogeniônico (pH), pressão parcial de oxigênio (PO ₂), pressão de dióxido de carbono (PCO ₂), saturação de oxigênio (SpO ₂), bicarbonato (HCO ₃ ⁻), glicose, lactato e potássio (K ⁺), obtidas das análises das bolsas contendo a solução CPDA-1. | 69 |
| Tabela 6 Coeficiente de correlação de Pearson entre os parâmetros hemoglobina livre (Hg livre), grau de hemólise (Hemólise), potencial hidrogeniônico (pH), pressão parcial de oxigênio (PO ₂), pressão de dióxido de carbono (PCO ₂), saturação de oxigênio (SpO ₂), bicarbonato (HCO ₃ ⁻), glicose, lactato e potássio (K ⁺), obtidas das análises das bolsas contendo a solução CPD/SAG-M. | 71 |

LISTA DE QUADROS

| | Página |
|---|--------|
| Quadro 1 Componentes das soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M onde foi acondicionado o sangue dos equinos. | 44 |
| Quadro 2 Tempo experimentais em que foram realizadas as análises laboratoriais das amostras do concentrado de hemácias de equinos armazenadas, distribuídos por parâmetros. | 45 |

ANEXOS

| | Página |
|---|--------|
| Anexo 1 Ficha resumida dos exames clínicos para a seleção dos cavalos doadores para o experimento. | 86 |
| Anexo 2 Quadro resumido dos exames laboratoriais para a seleção dos cavalos doadores para o experimento. Observação: Animais destacados em amarelo foram os descartados do experimento. | 87 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------------|---|
| μl | Microlitro |
| 2,3-DPG | 2,3-Difosfoglicerato |
| ACD | Ácido Citrato Dextrose |
| H_2O | Água |
| ATP | Trifosfato de Adenosina |
| HCO_3^- | Bicarbonato |
| CH | Concentrado de Hemácias |
| CHCM | Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média |
| CO_2 | Dióxido de Carbono |
| CPD | Citrato Fosfato Dextrose |
| CPD/SAG-M | Citrato, Fosforo, Dextrose, Salina, Adenina, Glicose, Manitol |
| CPDA-1 | Citrato Fosfato Dextrose Adenina |
| dl | Decilitro |
| Fe^{2+} | Ferro Ferroso |
| fL | Fentolitro |
| G | Gramas |
| GSH | Glutationa |
| Hg | Hemoglobina |
| H^+ | Íons de Hidrogênio |
| L | Litro |
| mL | Mililitro |
| mmHg | Milímetros de mercúrio |
| Mmol | Milimol |
| NADH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo |
| NADPH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida |
| O_2 | Oxigênio |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PO_2 | Pressão Parcial de Oxigênio |
| K^+ | Potássio |
| PCO_2 | Pressão Parcial de Dióxido de Carbono |

| | |
|------------------|------------------------------|
| PT | Proteínas Plasmáticas Totais |
| Q.S.P | Quantidade Suficiente Para |
| Na ⁺ | Sódio |
| SpO ₂ | Saturação de Oxigênio |
| VCM | Volume Corpuscular Médio |
| VG | Volume Globular |

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 18 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 18 |
| 3 HIPÓTESE | 18 |
| 4 REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 4.1 HISTÓRICO | 19 |
| 4.2 SELEÇÃO DE DOADORES E TIPOS SANGUÍNEOS | 21 |
| 4.3 FISIOLOGIA E METABOLISMO ERITROCITÁRIO | 23 |
| 4.3.1 Membrana dos eritrócitos | 25 |
| 4.3.2 Hemoglobina | 26 |
| 4.3.3 Energia celular | 28 |
| 4.4 BOLSAS PLÁSTICAS PARA ARMAZENAMENTO DE SANGUE | 30 |
| 4.4.1 Concentrado de hemácias | 33 |
| 4.5 LESÕES DE ARMAZENAMENTO EM BOLSAS DE SANGUE | 35 |
| 4.5.1 Alterações hematológicas | 35 |
| 4.5.2 Alterações hemogasométricas | 37 |
| 4.5.3 Alterações bioquímicas | 38 |
| 4.5.4 Contaminação bacteriana | 40 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS | 42 |
| 5.1 DOADORES | 42 |
| 5.1.1 Critérios de exclusão | 43 |
| 5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 43 |
| 5.3 ALIQUOTAGEM DAS AMOSTRAS | 46 |
| 5.4 ANÁLISES DAS AMOSTRAS | 48 |
| 5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 49 |
| 6 RESULTADOS | 50 |
| 6.1 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS | 50 |
| 6.1.1 Número de hemácias | 52 |
| 6.1.2 Volume corpuscular médio (VCM) | 52 |
| 6.1.3 Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 6.1.4 Volume globular (VG) | 54 |
| 6.1.5 Hemoglobina livre | 55 |
| 6.1.6 Grau de hemólise | 56 |
| 6.2 ANÁLISES HEMOGASOMÉTRICAS | 57 |
| 6.2.1 Potencial hidrogeniônico (pH) | 59 |
| 6.2.2 Pressão parcial de oxigênio (PO₂) | 59 |
| 6.2.3 Pressão de dióxido de carbono (PCO₂) | 60 |
| 6.2.4 Saturação de oxigênio (SpO₂) | 61 |
| 6.2.5 Bicarbonato (HCO₃⁻) | 62 |
| 6.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS | 63 |
| 6.3.1 Glicose | 65 |
| 6.3.2 Lactato | 65 |
| 6.3.3 Potássio (K⁺) | 66 |
| 6.4 MUDANÇAS PROPORCIONAIS EM VALORES PERCENTUAIS | 67 |
| 6.5 CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS | 68 |
| 7 DISCUSSÃO | 72 |
| 7.1 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS | 72 |
| 7.2 ANÁLISES HEMOGASOMÉTRICAS | 74 |
| 7.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS | 77 |
| 8 CONCLUSÃO | 80 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 81 |
| ANEXOS | 86 |

1. INTRODUÇÃO

A transfusão sanguínea é definida como uma terapia intravenosa realizada com sangue total ou seus componentes. As indicações são para diversos casos, como: restaurar a capacidade de transporte do oxigênio, hipovolemia, disfunções plaquetárias, deficiências de fatores de coagulação e hipoproteinemia (BROWN e VAP, 2015).

A medicina transfusional veterinária tem evoluído muito nas últimas décadas, acompanhando os avanços presentes na medicina humana, adaptando as diversas tecnologias para pacientes veterinários, como, por exemplo, o aumento da utilização de hemocomponentes em relação à transfusão de sangue total (SCHNEIDER, 1995). Esse aumento é devido às vantagens do fracionamento do sangue, que permite o uso otimizado em relação ao aproveitamento e eficácia, prolongamento do tempo de validade de todos os componentes sanguíneos, além de diminuir, consideravelmente, os riscos de reação transfusional, permitindo ainda que mais de um paciente possa beneficiar-se de apenas um doador (RAZOUK; REICHE, 2004).

Os avanços na medicina transfusional incluíram o desenvolvimento de soluções conservantes contidas nas bolsas de sangue (MUDGE et al., 2004). Desde 1943, com o desenvolvimento da primeira solução preservativa ácido-citrato-dextrose (ACD), muitos estudos têm sido realizados na tentativa de aprimorar a solução conservante, visando permitir a viabilidade das células por longos períodos de armazenamento, havendo o desenvolvimento, em seguida, das soluções citrato-fosfato-dextrose (CPD), citrato-fosfato-dextrose-adenina (CPDA-1) e citrato-fosfato-dextrose-salina-adenina-glicose-manitol (CPD/SAG-M), respectivamente (WARDROP et al., 1994; HESS, 2006; SOUSA et al., 2012).

Durante o período de armazenamento dos eritrócitos, ocorrem alterações hematológicas, hemogasométricas e bioquímicas, devido às mudanças metabólicas e estruturais, que afetam a viabilidade e a função destes e, conseqüentemente, comprometendo a função e diminuindo a sobrevivência celular, após a transfusão (ORLOV; KARKOUTI, 2015). Essas alterações são conhecidas como "lesões de armazenamento" (WARDROP et al., 1997).

As lesões de armazenamento variam com o tipo de solução conservante presente nas bolsas de sangue, uma vez que são observados, imediatamente após a coleta e durante o armazenamento, alterações nos parâmetros sanguíneos, em diferentes meios de conservação (WARDROP et al., 1994). As bolsas contendo soluções conservantes CPDA-1, são as mais utilizadas, atualmente, na medicina veterinária. No entanto as bolsas contendo CPD/SAG-M estão em ascensão na área, por apresentar aditivos que possibilitam maior tempo de

viabilidade dos componentes sanguíneos (SOUSA et al., 2012). Porém, a utilização das mesmas soluções, para a conservação de sangue, apresenta o tempo de armazenamento significativamente diferente entre as diferentes espécies, devido à variação do metabolismo eritrocitário. Desta forma, não é indicado utilizar como referência os protocolos estabelecidos de armazenamento de bolsas de sangue humano na medicina veterinária (MUDGE et al., 2004).

Apesar de haver estudos sobre avaliação de lesões de armazenamento em bolsas de sangue de algumas espécies, como caninos (WARDROP et al., 1994; COSTA JÚNIOR et al., 2008), felinos (BERTOLETTI, 2011), ovinos (SOUSA et al. 2013), asininos (TAVARES et al., 2011) e equinos (DURHAM, 1996; MUDGE et al., 2004; NIINISTÖ et al., 2008), ainda existe a necessidade de mais pesquisas, visando estabelecer protocolos de armazenamento de hemocomponentes nas diferentes espécies e soluções de armazenamento (SOUSA et al., 2012).

A transfusão sanguínea é um procedimento que, embora raramente empregada, tem importantes aplicações no manejo terapêutico de condições encontradas na prática equina, podendo o seu uso adequado ser uma condição de sobrevivência, em casos potencialmente graves (DURHAM, 1996; KUMAR, 2017). As transfusões de sangue em equinos são tipicamente realizadas em situações de emergência, embora, em alguns casos, a necessidade possa ser prevista como, por exemplo, em cirurgias pré-planejadas, em que os equinos podem receber sangue autólogo se doados com antecedência (NIINISTÖ et al., 2008).

Poucos estudos em equinos abordaram a transfusão sanguínea e o protocolo de armazenamento de bolsas de sangue, contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento hematológico, hemogasométrico e bioquímico de concentrado de hemácias de equinos armazenados em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M, visando fornecer um maior controle de qualidade deste hemocomponente.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as lesões de armazenamento pelas alterações hematológicas, hemogasométricas e bioquímicas, ocorridas no concentrado de hemácias de equinos armazenado em bolsas plásticas contendo dois diferentes tipos de solução conservadora: uma a CPDA-1 e a outra a CPD/SAG-M, durante 35 dias de armazenamento.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Avaliar as alterações hematológicas por meio de contagem global de hemácias, volume globular, índices hematimétricos (VCM e CHCM), concentração de hemoglobina livre e grau de hemólise, nas bolsas de concentrado de hemácias de equinos contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M.

2) Avaliar as alterações hemogasométricas pela mensuração do pH, PO₂, PCO₂, SpO₂ e bicarbonato (HCO₃⁻), nas bolsas de concentrado de hemácias de equinos contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M.

3) Avaliar as alterações bioquímicas pela mensuração das concentrações de glicose, lactato e potássio, nas bolsas de concentrado de hemácias de equinos contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M.

3. HIPÓTESE

Os concentrados de hemácias de equinos armazenados por 35 dias nas bolsas contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M possuem diferenças quando comparado o período e a intensidade das lesões de armazenamento.

4. REVISÃO LITERATURA

4.1 HISTÓRICO

A história da medicina transfusional é mencionada desde o período do Renascimento, em que o primeiro relato sobre a transfusão de sangue em humanos foi descrita por Stefano Infessura em 1492, quando houve uma tentativa de salvar o Papa Inocêncio VIII, por infusão de sangue pela boca, uma vez que pouco se conhecia sobre o conceito de circulação e havia total desconhecimento quanto ao método de acesso endovenoso, até aquele momento (GRAY, 1922).

No início do período moderno, graças a descobertas marcantes como a teoria da circulação, de William Harvey, em 1628, e a introdução das injeções endovenosas por Christopher Weren em 1656 houve grandes avanços nessa área de estudo (LANEVSCHI; WARDROP, 2001). Em seguida, os experimentos com transfusão de sangue foram realizados em etapas, inicialmente envolvendo transfusões de um animal para outro e transfusões de animais para o homem (GIANGRANDE, 2000). A primeira transfusão de sangue documentada com sucesso em animais foi feita por Richard Lower em 1665, quando o sangue foi retirado de um cão e substituído por sangue de outro cão (DAVIDOW, 2013). Dois anos depois (1667), Jean-Baptiste Denys realizou a primeira transfusão de sangue de animal para humano (GIANGRANDE, 2000). Desde então, várias transfusões sanguíneas foram realizadas em humanos, utilizando sangue de animais. Contudo, apesar dos vários progressos observados na medicina transfusional, em 1678, a morte de um paciente de Jean-Baptiste Denis, submetido a três transfusões, levantou uma controvérsia sobre os benefícios desta terapia e o Parlamento Francês proibiu a realização de transfusões sanguíneas em humanos, considerando-o como um ato criminoso. Em seguida, outros países também decretaram a mesma proibição e, como consequência, durante os 150 anos seguintes, não houve registro de qualquer estudo sobre transfusão sanguínea (GREENWALT, 1997; BAUER, 2004).

Em 1816, John Leacock, defendia que a transfusão de sangue poderia ser útil no tratamento de hemorragias e provou que o doador e o receptor deveriam ser da mesma espécie. Dois anos depois (1818), James Blundell, um obstetra do Guy's and St. Thomas' Hospitals, em Londres, após realizar, com êxito, várias experiências em animais, apresentou o seu primeiro relato de uma transfusão de sangue, de homem para homem, em um documento para a Sociedade Médico Cirúrgica de Londres, em 22 de dezembro de 1818 (GIANGRANDE, 2000; SCHMIDT & LEACOCK, 2002). Isso representou o início da era

moderna da medicina transfusional. Inúmeras tentativas foram praticadas para se atingir o sucesso nas transfusões que, mesmo sendo vista como um avanço, ainda apresentava problemas relacionados à coagulação do sangue e demais reações adversas (GREENWALT, 1997).

Somente no século XX, diversos avanços importantes tornaram a transfusão sanguínea mais segura, incluindo a descoberta de anticoagulantes e conservantes sanguíneos, bem como o desenvolvimento de testes de compatibilidade e reconhecimento dos tipos sanguíneos para a escolha do doador e o domínio das técnicas de esterilização, permitindo o uso mais difundido da hemoterapia e a formação dos bancos de sangue (GIANGRANDE, 2000).

O primeiro serviço de doadores de sangue do mundo foi estabelecido em Londres em 1921, denominado de Serviço de Transfusão de Sangue da Cruz Vermelha Britânica, mas foi a Segunda Guerra Mundial que impulsionou o desenvolvimento de bancos de sangue (GIANGRANDE, 2000; LANEVSCHI; WARDROP, 2001).

O desenvolvimento das soluções de armazenamento de eritrócitos foi lento e gradual, ocorrendo em etapas. As etapas incluíram a esterilização por calor, na década de 1940; o fosfato como conservante, na década de 1950; as bolsas plásticas para o armazenamento, na década de 1960; a adenina como conservante, na década de 1970 e as soluções aditivas, na década de 1980. Recentemente, uma melhor compreensão das lesões de armazenamento proporcionou um progresso adicional na concepção de soluções, permitindo o armazenamento de eritrócitos em melhores condições e por mais tempo (HESS, 2006).

Na medicina veterinária as transfusões de sangue só se tornaram comuns nos últimos 60 anos, devido aos avanços notáveis das técnicas e dos equipamentos. No entanto, à medida que o conhecimento e a disponibilidade de diferentes componentes sanguíneos aumentaram, a terapia transfusional tornou-se mais complexa por oferecer opções de aplicá-la de forma mais adequada, diminuindo as reações transfusionais (DAVIDOW, 2013).

Grande parte do atual protocolo de banco de sangue veterinário para preparação de componentes sanguíneos é baseado na literatura humana, sendo que alguns desses procedimentos foram modificados para uso veterinário. Os avanços na tecnologia do banco de sangue humano, como os conservantes de eritrócitos, foram recentemente adaptados para a medicina veterinária, incluindo também as recomendações sobre qualificações e saúde física dos doadores de sangue, procedimentos e equipamentos de coleta e terapia com componentes sanguíneos (SCHNEIDER, 1995).

4.2 SELEÇÃO DE DOADORES E TIPOS SANGUÍNEOS

A seleção dos animais doadores é uma etapa importante para se obter bolsas de sangue com qualidade e quantidade adequadas. Doadores equinos devem ser adultos, sadios e de grande porte (>500 kg) (MUDGE, 2014). Estes devem passar por exame físico de rotina, bem como exames laboratoriais, e deverão estar livres de agentes infecciosos transmissíveis como, por exemplo, o vírus da anemia infecciosa equina e hemoparasitas (DURHAM, 1996; BROWN; VAP, 2015), além de obter concentrações normais de volume globular (VG) (35-47%) e proteínas plasmáticas totais (PT) (5,8-8,7 g/dL) (LANEVSKI; WARDROP, 2001; KUMAR, 2017).

O doador equino ideal deve fornecer uma quantidade de sangue adequada para a condição do receptor, sem promover risco ao mesmo. Os equinos que são elegíveis como doadores podem doar de 6-8 litros de sangue, sendo que o sangue total pode ser obtido novamente no intervalo de quatro semanas. O sangue do doador deve ser coletado assepticamente por meio de venipunção da jugular (DURHAM, 1996; KUMAR, 2017).

Há situações clínicas em que a hemorragia intraoperativa é uma complicação antecipada da cirurgia equina como, por exemplo, dos seios nasais e paranasais, e os cavalos, frequentemente, realizam teste de compatibilidade para serem submetidos à transfusão de sangue homóloga antes da cirurgia de sinusite eletiva (DURHAM, 1996). Nesses casos é possível realizar a transfusão autóloga, quando planejada com antecedência, a qual possui vantagens potenciais para uma vida útil mais longa dos eritrócitos transfundidos, e risco minimizado de reações de transfusão (MUDGE et al., 2004).

Os eritrócitos possuem antígenos específicos (glicoproteínas ou glicolipídios) na superfície de suas membranas celulares que permitem sua classificação em grupos sanguíneos. Uma característica desses antígenos é sua capacidade de desencadear uma reação causada pela circulação de anticorpos anti-eritrócitos. Estes anticorpos podem ocorrer naturalmente ou serem induzidos após uma transfusão prévia. Uma situação grave e potencialmente fatal é aquela em que a interação com anticorpos leva à destruição por hemólise dos eritrócitos (LANEVSKI; WARDROP, 2001).

As considerações imunológicas de transfusão de sangue são importantes na possível existência de anticorpos anti-eritrocitários e diferenças antigênicas entre o sangue do doador e do receptor (DURHAM, 1996; LANEVSKI; WARDROP, 2001). Os indivíduos previamente sensibilizados são mais propensos a transportar anticorpos anti-eritrócitos patogênicos (KUMAR, 2017). Portanto, animais com histórico de prenhez, parto ou

transfusão devem ser excluídos do grupo de doadores por portar anticorpos eritrocitários, e são também considerados receptores de alto risco de reações adversas (DURHAM, 1996; MUDGE, 2014).

Os muares (burros e mulas) possuem naturalmente antígeno eritrocitário conhecido como fator jumento, portanto não devem ser usados como doadores de sangue para cavalos (MUDGE, 2014). No entanto, os potros de mula com isoeritrólise neonatal podem receber uma transfusão de um cavalo, não previamente sensibilizado por prenhez contra o fator jumento, porque se sabe que os cavalos estão livres de anticorpos que ocorrem naturalmente contra o fator jumento (KUMAR, 2017).

Em equinos, os antígenos sanguíneos estão agrupados em 7 sistemas (A, C, D, K, P, Q e U). Cada sistema possui vários subgrupos, o que resulta em mais de 400.000 possibilidades de diferentes tipos sanguíneos, tornado praticamente impossível uma transfusão sanguínea totalmente compatível (TOMLINSON, 2015). Porém, apenas os aloantígenos Aa e Qa são hemolisinas e extremamente imunogênicos, sendo que a maioria dos casos de isoeritrólise está associada a anticorpos anti-Aa ou - Qa (LASSEN & SWARDSON, 1995; KUMAR, 2017).

Nos cavalos, os grupos sanguíneos variam de acordo com as raças. Um doador geneticamente semelhante ao receptor é uma escolha natural, porque os padrões de aloantígenos eritrocitários geralmente são homólogos em algumas raças como, por exemplo, os Árabes, que possuem alta prevalência de antígenos Aa e Qa quando comparados a outras raças (BROWN; VAP, 2015; KUMAR, 2017).

O teste de compatibilidade por reação cruzada é o mais disponível em hospitais de referência de equídeos para detectar a presença de anticorpos que podem causar uma reação de transfusão (TOMLINSON, 2015). Mas em situações de emergência, uma primeira transfusão é frequentemente realizada sem testes de compatibilidade, devido à baixa taxa de produção de aloanticorpo espontâneo em cavalos (MUDGE, 2014). Esta transfusão geralmente é bem tolerada, porém o clínico não possui informações para prever quanto tempo as células transfundidas serão viáveis, pois, em equinos adultos, a meia vida das hemácias transfundidas pode variar entre 3 a 33 dias em média, a depender do grau de compatibilidade entre o doador e o receptor (TOMLINSON et al., 2015).

4.3 FISIOLOGIA E METABOLISMO ERITROCITÁRIO

O conhecimento da fisiologia e metabolismo das hemácias é importante para avaliar a eficácia de uma abordagem de preservação de bolsas de sangue, bem como a qualidade *in vitro* e *in vivo* das hemácias transfundidas (SCOTT et al., 2005).

Os eritrócitos são provenientes de células-tronco pluripotentes na medula óssea, através de um processo de maturação denominado eritropoiese (WEISS; WARDROP, 2010). A eritropoiese é predominantemente regulada por um fator de crescimento eritroide, a eritropoietina, cuja síntese é regulada pela hipóxia renal, em resposta a fatores como saturação de oxigênio da hemoglobina, concentração de hemoglobina, níveis plasmáticos de 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG), quantidade de eritrócitos, fluxo sanguíneo e taxa metabólica basal (SCOTT & STOCKHAM, 2011).

O processo de regulação, promovido pela adequada liberação de eritropoietina, estimula a eritropoiese, envolvendo seis estágios: rubriblasto, prorrubricito, rubricito, metarrubricito, reticulócito e eritrócito maduro (WEISS; WARDROP, 2010). A cada estágio de desenvolvimento sucessivo há uma redução do volume celular, condensação da cromatina, perda de nucléolos, diminuição do núcleo, ácido ribonucleico (RNA), mitocôndrias e aumento na síntese de hemoglobina, resultando em uma célula madura, com ausência de núcleo e organelas (SCOTT et al., 2005).

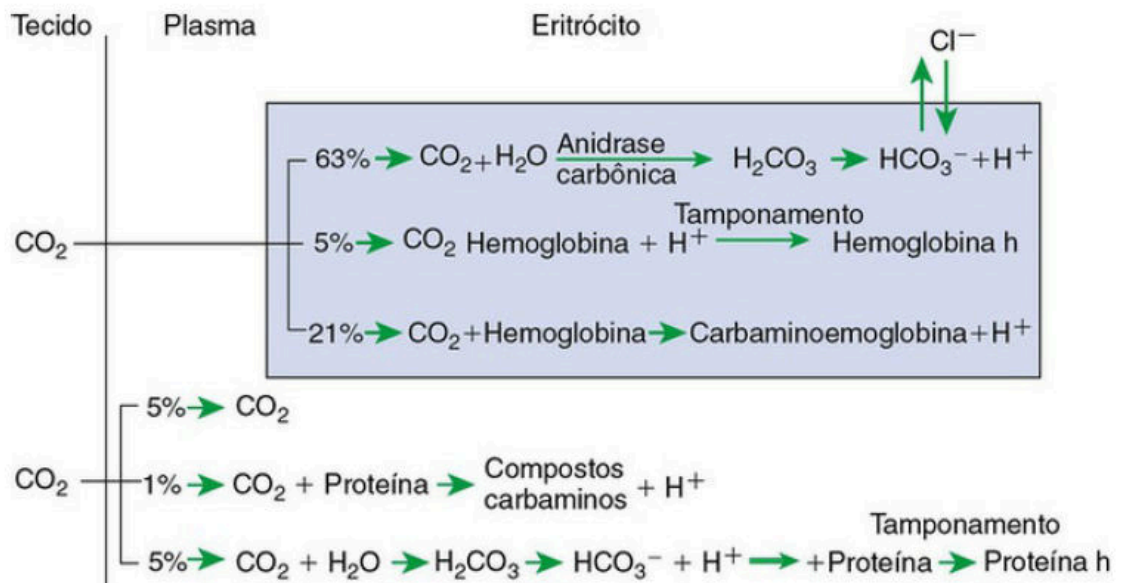
O reticulócito é o precursor do eritróide em estágio avançado, ou seja, quando o metarrubricito expele seu núcleo. O tempo e o estágio de maturação no qual os reticulócitos são normalmente liberados da medula variam entre as espécies. Cavalos saudáveis não liberam reticulócitos da medula óssea, estes também são raramente visualizados na circulação, por microscopia, em casos de anemia regenerativa (LASSEN; SWARDSON, 1995; WEISS; WARDROP, 2010). Não apenas os reticulócitos amadurecem na medula óssea, mas a resposta regenerativa também é lenta, então as respostas à anemia são muito difíceis de serem mensuradas na espécie equina (LASSEN; SWARDSON, 1995).

A morfologia e tempo de vida dos eritrócitos também variam entre as diversas espécies. Em equinos, o tempo de maturação dos eritrócitos é de aproximadamente 4 dias e, quando maduros, possuem a forma discóide e bicôncavo, com aproximadamente 5 a 6 µm de diâmetro (LASSEN; SWARDSON, 1995; WEISS; WARDROP, 2010) e com tempo de vida média de 150 dias (WEISS; WARDROP, 2010; SCOTT E STOCKHAM, 2011).

Os eritrócitos possuem funções vitais de transportar o oxigênio (O_2) e o dióxido de carbono (CO_2) e de realizar o tamponamento de íons de hidrogênio (H^+) (MACHADO et al., 2009). No transporte do O_2 dos pulmões para os tecidos do corpo, a troca de CO_2 é facilitada através de efeitos sinérgicos da hemoglobina, da enzima anidrase carbônica e da proteína banda 3, seguida pelo transporte e liberação de CO_2 dos tecidos para os pulmões (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

Ao contrário do O_2 que se liga apenas à hemoglobina, o CO_2 é transportado de várias formas (Figura 1). No transporte dos tecidos para os pulmões, o CO_2 se difunde para dentro das hemácias e a enzima anidrase carbônica catalisa sua reação com água (H_2O), formando o ácido carbônico (H_2CO_3) que se dissocia em H^+ e bicarbonato (HCO_3^-). A hemoglobina age como tampão, removendo o H^+ , e o HCO_3^- se difunde da célula para o plasma, facilitando a conversão adicional de CO_2 em HCO_3^- (KLEIN, 2014). Quando as hemácias retornam para os pulmões, as reações são convertidas e o CO_2 é liberado pela expiração. Cerca de 70% do CO_2 formado nos tecidos é transportado para os pulmões por este sistema e cerca de 20% do CO_2 se difunde dos tecidos para dentro das hemácias, parte dele se ligando à hemoglobina para formar carbaminoemoglobina e transportado aos pulmões (SCOTT & STOCKHAM, 2011).

Figura 1: Desenho esquemático do transporte de dióxido de carbono (CO_2) no sangue. Observação: Todas as reações mostradas no diagrama podem ser invertidas quando o sangue atinge o pulmão e o CO_2 difunde-se nos alvéolos. Legenda: H_2O (água), H_2CO_3 (ácido carbônico), HCO_3^- (bicarbonato), H^+ (íons de hidrogênio).



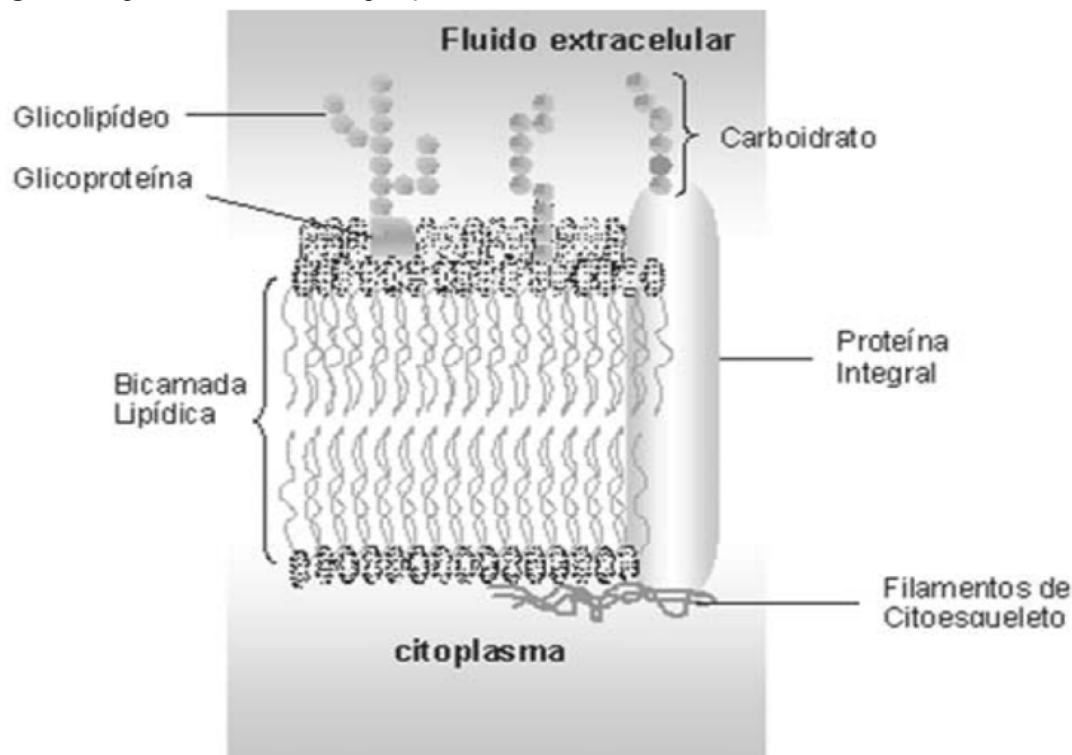
Fonte: Klein, 2014.

O transporte bem sucedido do oxigênio depende basicamente da eficácia de três elementos do metabolismo das hemácias: a membrana, a hemoglobina e o metabolismo energético (SCOTT et al., 2005).

4.3.1 Membrana dos eritrócitos

A membrana dos eritrócitos, assim como as membranas das demais células, é uma estrutura flexível, composta por uma bicamada lipídica semipermeável, proteínas e carboidratos (Figura 2). As proteínas da membrana formam seu citoesqueleto, que desempenha a importante finalidade de manter a integridade, formato e deformabilidade da membrana, além do transporte de macromoléculas, para que os eritrócitos desempenhem suas funções (KRIEBARDIS et al., 2007).

Figura 2: Figura ilustrativa da composição da membrana celular.



Fonte: (MURADOR; DEFFUNE) 2007.

A membrana eritrocitária é composta por cerca de 40% de lipídeos, com quantidades equimolares de colesterol e fosfolipídeos não esterificados e pequenas quantidades de ácidos graxos livres e glicolípidos. Cerca de 52% da membrana são compostas por proteínas que podem ser categorizadas como integrais e periféricas, de acordo com sua localização na

bicamada lipídica (SCOTT et al., 2005). Proteínas de membrana integrais, como a glicoforina e a proteína banda 3, atravessam a membrana e contêm extensões para dentro ou para fora do eritrócito, com a principal função de transportar antígenos de hemácias e atuar como receptores e transportadores, valendo ressaltar também que as proteínas integrais são responsáveis por caracterizar o tipo sanguíneo. As proteínas periféricas, como a espectrina, anquirina, proteína 4.1, actina e a aducina, são encontradas apenas na superfície citoplasmática da membrana, formando o citoesqueleto das hemácias (WOLFE, 1985; MURADOR; DEFFUNE, 2007).

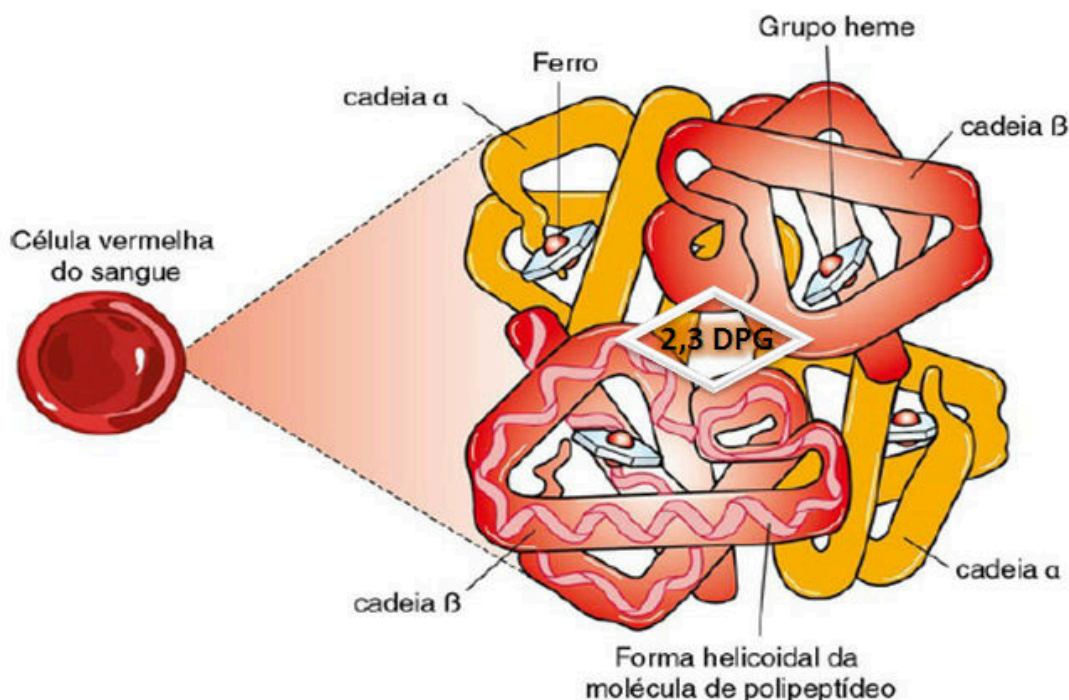
A barreira de permeabilidade seletiva da membrana eritrocitária assegura a composição interna constante das células, através do controle da transferência ativa e passiva de uma variedade moléculas. O gradiente de concentração é controlado pela bomba de Na^+/K^+ , que bombeia potássio para dentro da célula em troca de sódio e mantém um grau de concentração em equilíbrio (FLATT et al., 2014).

A capacidade de transporte de O_2 e CO_2 depende das condições de adaptação circulatória, da hemoglobina e da banda 3. A proteína banda 3, como transportador de membrana, medeia as trocas de cloreto(Cl^-) e HCO_3^- , aumentando então a capacidade sanguínea de transporte de CO_2 , garantindo a homeostase e o equilíbrio ácido-básico. Por interação com lipídeos e proteínas, a banda 3 une o complexo multiproteico do citoesqueleto e confere aos eritrócitos propriedades mecânicas e elásticas, regulando a viscosidade sanguínea (MURADOR; DEFFUNE, 2007), permitindo assim que os eritrócitos sejam maleáveis e forneçam oxigênio à medida que fluem em vasos sanguíneos com diferentes diâmetros, sob uma variedade de condições de fluxo sanguíneo (YOSHIDA; SHEVKOPLYAS, 2010).

4.3.2 Hemoglobina

A hemoglobina é o principal conteúdo do eritrócito, representando, aproximadamente, 95% de sua matéria seca. O oxigênio é muito pouco solúvel no plasma, sendo a hemoglobina responsável por distribuir oxigênio suficiente para os tecidos (KLEIN, 2014). A molécula de hemoglobina é formada por quatro subunidades proteicas heme (protoporfirinas), cada uma composta por uma cadeia polipeptídica, ligada a um grupamento protéico, o heme, que por sua vez é formado pela associação do anel tetrapirrólico como o átomo de Fe ferroso (Fe^{2+}) no centro. Cada Fe^{2+} pode combinar-se reversivelmente com uma única molécula de O_2 . Portanto, uma molécula de hemoglobina pode se combinar reversivelmente com até quatro moléculas de O_2 (Figura 3) (PEÑUELA, 2005).

Figura 3: Figura ilustrativa da estrutura da molécula de hemoglobina mostrando os dois pares de cadeias de polipeptídeo. Observação: Dentro de cada cadeia, localiza-se um heme, totalizando quatro ao todo. O ferro ferroso (Fe^{2+}) no centro de cada heme oferece o sítio de ligação para o oxigênio molecular.



Fonte: Adaptado de Klein, 2014.

Quando a molécula de hemoglobina está totalmente oxigenada, podendo obter até 4 moléculas de O_2 , é chamada de oxihemoglobina; inversamente, quando a hemoglobina está desprovida de oxigênio é chamada de desoxihemoglobina. A captação e liberação de O_2 pela molécula de hemoglobina é controlada pelo fosfato orgânico 2,3-DPG, que se encontra ligado às cadeias de globina, resultando em uma conformação de desoxihemoglobina, que facilita a liberação de oxigênio para os tecidos (SCOTT & STOCKHAM, 2011).

A quantidade de oxigênio combinada com a hemoglobina é determinada pela pressão parcial de oxigênio (PO_2). Um aumento complementar na PO_2 adiciona pouco oxigênio à hemoglobina e, nesse caso, a hemoglobina está saturada com O_2 , pois cada átomo de ferro está associado a uma molécula de oxigênio. O eritrócito quando é exposto a uma menor PO_2 , perde oxigênio para os tecidos, e o O_2 , que continua combinado com a hemoglobina, forma uma reserva para situações de emergência (KLEIN, 2014). Portanto, o aumento dos níveis de 2,3-DPG, desencadeados pela hipóxia tecidual, aumentará a dissociação da oxihemoglobina e, consequentemente, haverá maior oferta de O_2 para os tecidos (TSAI et al., 2010).

Existem outros fatores, além do 2,3 DPG e PO_2 , que interferem na afinidade da hemoglobina pelo O_2 , tais como a temperatura, a pressão parcial do dióxido de carbono (PCO_2) e o potencial hidrogeniônico (pH). O aumento do metabolismo tecidual produz calor,

elevando a temperatura corpórea e, conseqüentemente, aumentando a dissociação da oxiemoglobina. Inversamente, a diminuição excessiva da temperatura do sangue, como ocorre na hipotermia, diminui a dissociação da oxiemoglobina (KLEIN, 2014). A dissociação da oxiemoglobina resultante do aumento na PCO_2 é denominada de efeito Bohr. O efeito Bohr resulta em parte da combinação do dióxido de carbono com a hemoglobina, mas principalmente da produção de íons hidrogênio, que diminuem o pH. Uma alteração no pH altera a ligação do oxigênio mudando a estrutura da hemoglobina, ou seja, em um pH mais ácido aumenta a dissociação da oxiemoglobina e, inversamente, no pH mais básico diminui a dissociação do mesmo (EDWARDS; MARTIN, 1966).

Quando os eritrócitos envelhecem na circulação, tornam-se mais rígidos, esféricos e menos capazes de passar por microvasos. No final do seu ciclo de vida, os glóbulos vermelhos são reconhecidos e fagocitados por macrófagos, ocorrendo à degradação da hemoglobina. A porção heme é retirada das cadeias de globina e convertido em bilirrubina, Fe^{2+} e monóxido de carbono (CO), e as cadeias de globina são degradadas em aminoácidos (PEÑUELA, 2005).

4.3.3 Energia celular

Os eritrócitos maduros de mamíferos não possuem núcleos e, conseqüentemente, não podem sintetizar ácidos nucleicos ou proteínas. A perda de mitocôndrias durante a maturação dos reticulócitos resulta na perda da capacidade de fosforilação oxidativa, ou seja, da síntese de ATP pelo ciclo de Krebs. Sendo assim, utilizam-se 4 vias metabólicas nos eritrócitos; o shunt Rapoport-Luebering, a via de redução da metahemoglobina e, principalmente, as vias do ciclo da glicólise (Embden-Mayerhof) e das pentoses fosfato, que suprem as necessidades energéticas dos eritrócitos para a manutenção de sua forma e funções (SCOTT & STOCKHAM, 2011; FLATT et al., 2014; OBRADOR et al., 2015).

A glicose é o substrato primário para o metabolismo energético nos eritrócitos de todas as espécies, exceto o suíno, servindo como uma molécula intermediária em uma variedade de processos metabólicos (MUDGE et al., 2004; WEISS; WARDROP, 2010). Nos eritrócitos maduros dos mamíferos, a principal via catabólica para a utilização de glicose é a glicólise anaeróbica através da via Embden-Meyerhof. Neste processo, a glicose é clivada para piruvato e reduzida ao ácido láctico, um processo que gera 2 mols de ATP e lactato para cada mol de glicose (OBRADOR et al., 2015). O lactato produzido não é utilizado pelos eritrócitos e, através da circulação sanguínea, é transportado até o fígado para ser metabolizado (FLATT et al., 2014).

Embora as demandas metabólicas sejam menores do que em outros tipos de células sanguíneas, os eritrócitos necessitam de energia na forma de ATP para a manutenção da forma, deformabilidade, fosforilação de membranas fosfolipídicas e proteínas, transporte ativo de membrana de várias moléculas, síntese parcial de purinas e pirimidinas e síntese de glutathiona (FLATT et al., 2014). Como os eritrócitos maduros dependem exclusivamente da glicólise anaeróbica para a geração de ATP, as deficiências de enzimas envolvidas na glicólise podem resultar na formação de equinócitos, uma alteração na forma das hemácias caracterizada pela presença de pequenas espículas na membrana dos eritrócitos, além de uma menor sobrevivência destas células (WARDROP, 2010).

A via das pentoses fosfato, é uma derivação do metabolismo de glicose que gera a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), que mantém a glutathiona (GSH) em um estado reduzido, sendo a NADPH e a GSH os principais agentes redutores nos eritrócitos com função de manter a hemoglobina e outras proteínas eritrocitárias em estado reduzido funcional, fornecendo aos eritrócitos uma proteção adicional contra lesões oxidativas (SCOTT et al., 2005; WEISS; WARDROP, 2010).

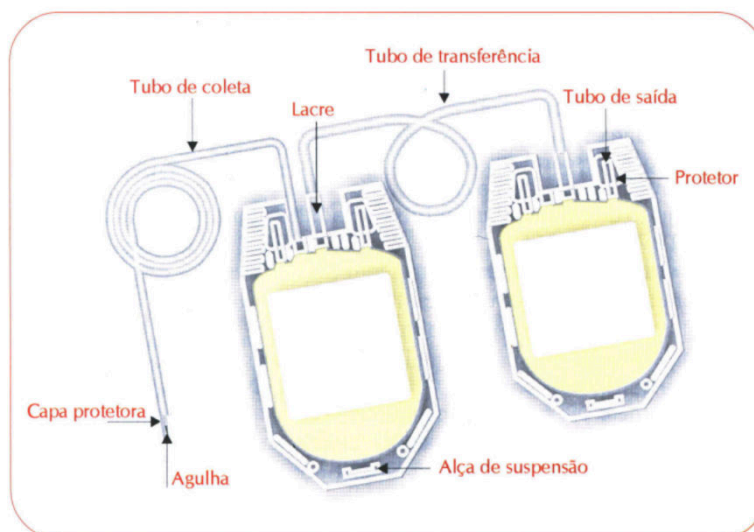
O shunt Rapoport-Luebering é responsável pela produção de 2,3-DPG para o controle da afinidade do oxigênio pela hemoglobina, promovendo a liberação de O₂ para os tecidos (SCOTT et al., 2005; SCOTT; STOCKHAM, 2011). Os eritrócitos de cães, cavalos, porcos e homens, normalmente contêm altas concentrações de 2,3-DPG, enquanto que os gatos e ruminantes domésticos possuem baixas concentrações. A síntese de 2,3-DPG é estimulada pelo aumento da concentração de fosfato e do pH e nas condições de hipóxia. Por outro lado, a acidose e a hipofosfatemia resultam em concentrações diminuídas de 2,3-DPG. Nos casos mais graves de hipoxemia a resposta pode ser prejudicial, porque a hemoglobina pode não estar totalmente saturada (WEISS; WARDROP, 2010).

A via de redução da metahemoglobina, que reduz o ferro heme férrico para a forma ferrosa, é responsável por prevenir a desnaturação da hemoglobina (SCOTT et al., 2005). A metahemoglobina geralmente representa menos de 1% da hemoglobina total, porque é constantemente reduzida de volta à hemoglobina por uma reação enzimática do citocromo-b5-redutase presente nos eritrócitos. A redução da metahemoglobina é mais corretiva do que protetora, e ocorre em níveis muito mais altos na presença de compostos oxidativos (WEISS; WARDROP, 2010).

4.4 BOLSAS PLÁSTICAS PARA ARMAZENAMENTO DE SANGUE

Na medicina veterinária, as bolsas para transfusão sanguínea são geralmente as mesmas utilizadas na medicina humana (WARDROP et al., 1994). As bolsas plásticas de armazenamento de sangue são constituídas pelo material policloreto de vinila (PVC), plastificado com o di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) e o trioctiltrimelitato (TOTM), para evitar a hemólise do eritrócito em contato direto com o PVC. São estéreis e apirogênicas, e possuem tubo de coleta com agulha, tubos de saída, soluções anticoagulantes e/ou preservativas, e tubos de transferência e recipientes associados (Figura 4), quando existentes (BRASIL, 1998; SCOTT et al., 2005; BRASIL, 2014).

Figura 4: Desenho esquemático do conjunto de bolsas plásticas de coleta de sangue: bolsa primária e satélite.



Fonte: SOARES et al. (1998).

O objetivo dos componentes das soluções anticoagulantes e preservativas, presentes nas bolsas de sangue, é permitir a viabilidade das células por mais tempo de armazenamento (SOUSA et al., 2012). As atuais soluções de armazenamento de eritrócitos funcionam bem para os bancos de sangue, permitindo o armazenamento das bolsas de sangue por 5 a 7 semanas. O desenvolvimento dessas soluções foi lento, mas, graças ao melhor entendimento científico sobre as lesões de armazenamento, possibilitou tornar as soluções conservantes ainda melhores (HESS, 2006).

Estudos realizados por Meryman et al. (1986), em sangue humano, demonstraram que os eritrócitos poderiam ser armazenados por muitos meses em soluções que mantivessem suas concentrações de ATP. Estas descobertas significaram que a vida útil limitada dos

eritrócitos, estocados em bolsas, era um resultado das condições de armazenamento, não um limite intrínseco imposto pelas células (HESS, 2006).

Högman et al. (1985) mostraram em um estudo sobre o mecanismo de perda de viabilidade de eritrócitos humanos, durante o armazenamento de bolsas de sangue contendo a solução SAG-M, que o rejuvenescimento das concentrações de ATP no período final do armazenamento convencional, restaurando o pH e as reservas de adenilato, melhorou a recuperação da viabilidade dos eritrócitos após a transfusão, reduzindo o número de células que não circulantes em menos de 50%. Assim, a remoção dos eritrócitos da circulação sanguínea não significa que as células morreram, apenas que elas foram marcadas para a remoção. No entanto, em vez de corrigir as lesões de armazenamento reversíveis, após terem ocorrido, é mais eficiente tentar manter a concentração de ATP, prevenindo as consequências da redução de sua disponibilidade para as células (HESS, 2006).

Na medicina veterinária, duas soluções conservantes, o citrato fosfato-dextrose-adenina (CPDA-1) e ácido-citrato-dextrose (ACD), são comumente utilizados para armazenamento de sangue (KUMAR, 2017). O citrato é um anticoagulante e tamponante, influenciando o pH intracelular, além de conservar a membrana eritrocitária; a dextrose é responsável por fornecer glicose para a manutenção energética eritrocitária; o fosfato é responsável pela produção de trifosfato de adenosina (ATP) e reestruturação de 2,3 difosfoglicerol (2,3-DPG), um componente que interfere diretamente na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, além de ser uma substância tamponante (WARDROP et al., 1994; HÖGMAN, 1998); a adenina promove mais adenilato, sendo a mesma importante para a síntese de ATP, podendo aumentar as reservas desse nucleótideo no interior das células armazenadas, reduzindo a fragilidade osmótica e promovendo maior sobrevivência dos eritrócitos conservados nas bolsas plásticas (AUTHEMENT et al., 1986; HESS, 2006).

As bolsas contendo a solução CPDA-1 são as mais utilizadas atualmente na medicina veterinária transfusional por manter teores mais elevados de DPG e ATP (BROWN; VAP, 2015), porém, as bolsas com CPD/SAG-M estão em ascensão na área por apresentar solução aditiva que possibilita maior tempo de viabilidade dos componentes sanguíneos (SOUSA et al., 2012).

A solução aditiva SAG-M é composta por soro fisiológico, adenina, glicose e manitol (BRASIL, 2014), que são fatores importantes para a manutenção do metabolismo energético e viabilidade durante o armazenamento das hemácias, podendo ser adicionada ao sangue do qual o plasma foi extraído, ou seja, no concentrado de hemácias (CH) (LANEVSKI; WARDROP, 2001). A SAG-M é a solução aditiva padrão usada na Europa, e duas variantes

(AS-1 e AS-5), que diferem basicamente nas concentrações de sal, açúcar e manitol, são amplamente usadas nos EUA (HESS, 2006). O manitol é um conservante dos eritrócitos por funcionar como um eliminador de radicais livres, além de estabilizar a membrana eritrocitária, por fornecer um suporte osmótico e neutralizar a hemólise causada pela fragilidade osmótica (HÖGMAN, 1998; HESS, 2006).

No armazenamento de sangue humano e canino algumas orientações já foram estabelecidas, tais como o tempo de armazenamento em diferentes soluções conservadoras (LANEVSKI; WARDROP, 2001). Porém, pesquisas demonstram que a utilização das mesmas soluções para a conservação de sangue apresenta o tempo de viabilidade diferente entre as espécies, sendo assim, não é indicado usar como referência o tempo de conservação do sangue humano ou de canino (DURHAM, 1996).

Em estudo para avaliar as diferenças do tempo de armazenamento entre cães e seres humanos, verificou-se que o concentrado de hemácias (CH) de cães armazenado em bolsas CPDA-1 permitiu o tempo de armazenamento por até 21 dias e em bolsas CPD/SAG-M por até 35 dias. Em CH de humanos, essas mesmas soluções permitiram o armazenamento por até 35 e 42 dias, respectivamente (WARDROP et al., 1997; HÖGMAN, 1998). Essa variação ocorre por haver diferenças significativas no metabolismo de eritrocitário entre as espécies como, por exemplo, as concentrações de ATP e eletrólitos intracelulares, levando as respostas de armazenamento alteradas. Por isso, existe a necessidade de estudos específicos para a elaboração de protocolos ideais para o armazenamento de sangue das diferentes espécies domésticas na medicina veterinária, incluindo a espécie equina (MUDGE et al., 2004).

Bertoletti (2011) avaliou a influência da peroxidação lipídica e parâmetros bioquímicos e hematológicos, sobre a diminuição da viabilidade eritrocitária no sangue total de felinos armazenados em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M, durante o período de armazenamento de 28 dias, e concluiu que a solução CPD/SAG-M mostrou-se mais eficiente que a CPDA-1 na manutenção da viabilidade do sangue felino a partir do 14º dia.

Sousa et al. (2013) avaliaram as alterações hematológicas, hemogasométricas e bioquímicas durante o armazenamento de sangue total de ovinos armazenados em solução CPDA-1 por 35 dias. Ao final do experimento concluíram que é viável manter estas bolsas armazenadas por esse período, porém consideraram a necessidade de mais estudos para avaliar a viabilidade destas após o período de 35 dias.

Tavares et al. (2011) avaliaram as alterações hemogasométricas do sangue total de asininos armazenados em bolsas CPDA-1 durante 42 dias e concluíram que as alterações hemogasométricas observadas no experimento (diminuição do pH e bicarbonato e aumento da

PO₂ e PCO₂) não inviabilizaram a utilização terapêutica destas bolsas de sangue armazenadas por esse período.

Mudge et al. (2004) compararam a viabilidade do sangue total de equinos armazenados em quatro recipientes diferentes: garrafas de vidro contendo solução ACD, bolsas plásticas contendo ACD, citrato-fosfato-dextrose (CPD) e CPDA-1, durante o período de 35 dias, e concluíram que os valores hematológicos e bioquímicos sugeriam melhor viabilidade dos eritrócitos armazenados nas bolsas contendo a solução CPDA-1, do que nos demais métodos de armazenamento.

Niinistö et al. (2008) avaliaram o armazenamento de concentrado de hemácias de equinos armazenados em bolsas contendo a solução CPD/SAG-M durante o período de 35 dias, pela mensuração de constituintes hematológicos, bioquímicos e hemogasométricos, e concluíram que o concentrado de hemácias de equinos pode ser armazenados por pelo menos 35 dias.

4.4.1 Concentrado de Hemácias

O avanço nas técnicas de separação dos componentes sanguíneos proporciona ao médico veterinário a oportunidade de administrar um componente sanguíneo específico conforme a necessidade do paciente (KUMAR, 2017).

Os hemocomponentes e hemoderivados são produtos distintos. Os produtos obtidos a partir do sangue total, por meio de processos físicos (centrifugação, congelamento) são denominados hemocomponentes e os produtos obtidos a partir do fracionamento do plasma, por processos físicoquímicos, são denominados hemoderivados. Existem duas formas para obtenção dos hemocomponentes, a mais comum é a coleta do sangue total e a outra forma, mais específica e de maior complexidade, é a coleta por meio de aférese. A aférese é um procedimento caracterizado pela retirada do sangue do doador, seguida da separação de seus componentes por um equipamento específico, retenção do componente sanguíneo desejado e devolução dos demais componentes ao doador (BRASIL, 2014)

O concentrado de hemácias (CH) é constituído por eritrócitos que permanecem na bolsa após a centrifugação, sendo a maior parte do plasma extraído para uma bolsa-satélite (RAZOUK; REICHE, 2004; DAVIDOW, 2013). A técnica de separação também pode ser realizada por sedimentação por gravidade (DURHAM, 1996), sendo que na espécie equina os eritrócitos tendem a sedimentar mais rapidamente por causa da formação de *rouleaux*, uma junção das hemácias em forma de pilhas de moedas, comum em equinos por obter a carga da

membrana eritrocitária (potencial zeta) reduzida, em comparação as demais espécies (WEISS; WARDROP, 2010).

O CH deve ser armazenado à temperatura entre 2 a 6°C (D'ALESSANDRO et al., 2010; ORLOV; KARKOUTI, 2015), porém a refrigeração torna as plaquetas e os leucócitos inevitavelmente inviáveis (OHTO & NOLLET, 2011; OBRADOR et al., 2015).

Em humanos, o volume globular (VG) do CH deve estar entre 65% a 75% nas bolsas cuja solução preservativa seja CPDA-1, e entre 52%-60% quando estocados em soluções aditivas (RAZOUK; REICHE, 2004). O concentrado de hemácias possui vantagens sobre o sangue total de possuir a mesma capacidade de oxigênio com a metade do volume, diminuindo assim a sobrecarga de volume transfundido, além de minimizar a ocorrência de reações transfusionais, devido à menor exposição a proteínas antigênicas e componentes desnecessários (SCHNEIDER, 1995; RAZOUK; REICHE, 2004). A volemia pode ser controlada com a administração de fluidos cristalóides ou colóides para substituir, caso necessário, o volume sanguíneo perdido, como nos casos de hemorragia aguda (HURCOMBE et al., 2007).

A indicação de transfusão de CH, em animais e humanos, é para reparar ou prevenir a deficiência na capacidade de carrear oxigênio aos tecidos, ou seja, em casos de anemia (HURCOMBE et al., 2007). Porém nem todo estado de anemia exige a transfusão de CH, pois o organismo possui mecanismos compensatórios, tais como a elevação do débito cardíaco e a diminuição da afinidade da hemoglobina pelo O₂, que muitas vezes consegue reduzir o nível de hipóxia tecidual (BRASIL, 2014; BROWN e VAP, 2015). No entanto, condições como doença pulmonar ou cardiovascular devem ser levadas em consideração, pois o equino, nestes casos, tem menor capacidade de compensar a anemia (MUDGE, 2014).

Os animais domésticos, em geral, que necessitam de transfusão de CH, demonstram palidez, intolerância a exercício, fraqueza, taquipneia e taquicardia e hipotensão. Esses sinais clínicos dependem da rapidez e a gravidade com que a anemia se desenvolve e estão relacionados à diminuição da oferta de oxigênio, porque a hemoglobina desempenha um papel significativo na administração de oxigênio às células (LASSEN; SWARDSON, 1995; DAVIDOW, 2013).

O concentrado de hemácias é utilizado tanto como medida de suporte para cuidados intensivos, como, por exemplo, nos casos de isoeritrolise neonatal (BROWN; VAP, 2015), e nos casos agudos de babesiose equina (WISE et al., 2013), como também é indicado para equinos submetidos a intervenções operacionais, com perda significativa de sangue (HÉBERT et al., 2005; NIINISTÖ et al., 2008).

As indicações de transfusão de CH em casos de perda aguda de sangue em equinos adultos são: perda sanguínea superior a 30%; volume globular inferior a 20%; concentração de lactato sanguíneo de 4 mmol/L, ou mais após fluidoterapia, e taxa de extração de oxigênio igual ou superior a 50% (MUDGE, 2014). Também há várias doenças que podem resultar em perda crônica de sangue em equinos, sendo desconhecido até o desenvolvimento de sinais clínicos de anemia, devido à adaptação fisiológica à hipóxia tecidual, que se desenvolve gradualmente, tais como o sangramento de lesões gastrintestinais, doenças renais, disfunções hemostáticas e ectoparasitos hematófagos (LASSEN; SWARSON, 1995).

As transfusões sanguíneas são tipicamente realizadas em situações de emergência, porém em alguns casos, como a cirurgia sinusal em equinos, a necessidade pode ser prevista (DURHAM, 1996), sendo possível realizar a transfusão autóloga, que possui vantagens potenciais para uma vida útil mais longa dos eritrócitos transfundidos e risco minimizado de reações transfusionais (MUDGE et al., 2008). Em equinos adultos, a meia vida das hemácias transfundidas pode variar entre 3 a 33 dias em média, a depender do grau de compatibilidade entre o doador e o receptor (TOMLINSON et al., 2015).

4.5 LESÕES DE ARMAZENAMENTO EM BOLSAS DE SANGUE

Os procedimentos de coleta, processamento da bolsa de sangue e o armazenamento do concentrado de hemácias em um refrigerador expõem os eritrócitos a um ambiente diferente da circulação sanguínea, e os seus processos normais de senescência são alterados (YOSHIDA; SHEVKOPLYAS, 2010). O tempo de viabilidade dos eritrócitos em bolsas de sangue e sobrevivência após a transfusão varia de acordo com o desenvolvimento gradativo das lesões de armazenamento. As lesões de armazenamento são expressas através das alterações hematológicas, hemogasométricas e bioquímicas, devido às mudanças fisiológicas, metabólicas e estruturais dos eritrócitos (KOCH et al., 2008; HANN et al., 2014; ORLOV; KARKOUTI, 2015).

A avaliação da viabilidade celular em um determinado meio de armazenamento é realizada por estudos *in vitro*. Os indicadores *in vitro*, comumente utilizados para a avaliação da sobrevivência dos eritrócitos, após um período de armazenamento, incluem os níveis de ATP e 2,3-DPG e, principalmente, a avaliação da porcentagem de hemólise, pH e as concentrações de sobrenadante de sódio, potássio e glicose (WARDROP et al., 1994).

4.5.1 Alterações hematológicas

A função das soluções conservadoras nas bolsas de sangue, durante o armazenamento dos eritrócitos, é neutralizar os danos metabólicos e da membrana, mantendo a funcionalidade e a viabilidade destas células ao longo do período de armazenamento (HÖGMAN, 1998). Porém, mesmo com a presença da solução conservadora, a funcionalidade e a viabilidade dos eritrócitos são progressivamente prejudicadas durante o armazenamento devido às alterações metabólicas, o aumento do estresse oxidativo e danos à membrana (HESS, 2006; ORLOV; KARKOUTI, 2015).

O armazenamento dos eritrócitos entre 2-6°C reduz a taxa metabólica e ajuda a manter a sua funcionalidade e a viabilidade. Como a atividade metabólica não cessa completamente durante o armazenamento, a glicose ou a dextrose são adicionadas aos meios de armazenamento para permitir que os eritrócitos continuem a glicólise e assim produzirem ATP, 2,3-DPG e NADH suficientes durante um período de armazenamento (ZUBAIR, 2010; ORLOV; KARKOUTI, 2015).

As soluções conservadoras estão longe de fornecer condições normais e fisiológicas aos eritrócitos, apesar de fornecerem fontes de energia para a manutenção do metabolismo eritrocitário. A sobrevivência dos eritrócitos é limitada tanto pela redução da fonte energética ao longo do armazenamento, como pelo envelhecimento natural das hemácias (D'ALESSANDRO et al., 2010).

Os conservantes presentes na bolsa de sangue possuem quantidades limitadas de glicose para manter os níveis de ATP e 2,3-DPG, conseqüentemente o consumo diminui os níveis de ATP, pH e 2,3-DPG, induzindo a mudanças morfológicas e fisiológicas nas membranas dos eritrócitos. Em geral, as hemácias armazenadas apresentam maior fragilidade osmótica e redução da deformabilidade (HÖGMAN, 1998; ZUBAIR, 2010).

Durante o período de armazenamento, os eritrócitos são expostos ao estresse oxidativo e sofrem alterações metabólicas que afetam o citoplasma e, principalmente, a membrana eritrocitária, cujas partes são difundidas na superfície como microvesículas (HESS, 2006; FLEGEL et al., 2014). A oxidação progressiva das proteínas do citoesqueleto e o acúmulo de hemoglobina desnaturada nos eritrócitos, proporcional ao tempo de armazenamento, possuem um importante papel nas alterações referentes às lesões de armazenamento (KRIEBARDIS et al., 2007).

A membrana eritrocitária pode apresentar uma série de alterações morfológicas durante o período de armazenamento, promovendo o surgimento de microvesículas e aumento gradual

da fragilidade osmótica, sendo que algumas sofrem lise, levando à diminuição no número de hemácias e aumento da hemoglobina livre (HESS, 2010).

Segundo D'Alessandro et al. (2010), as lesões de armazenamento evidentes em humanos, durante o período de armazenamento, são alterações na morfologia dos eritrócitos, caracterizadas por formação de várias espículas na membrana (equinócitos) e, por fim, a formação de uma célula esferóide (esferócito), mas que, após a transfusão, ocorre a reversibilidade dessas alterações, sendo estas inversamente proporcionais à duração do armazenamento. As alterações morfológicas nos eritrócitos podem influenciar no seu transporte pelos microvasos sanguíneos e reduzir a sobrevivência pós transfusional, pois as células alteradas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos (SCOTT et al., 2005).

Na avaliação dos parâmetros hematológicos em algumas espécies domésticas, alguns estudos não apresentaram alterações estatisticamente significativas durante o período de armazenamento, como em cães, equinos e gatos (COSTA JÚNIOR et al., 2008; NIINISTÖ et al., 2008; BERTOLETTI, 2011). Entretanto, houve estudos que demonstraram alterações quanto à diminuição significativa na contagem de eritrócitos e aumento do VCM, em ovinos (SOUZA et al., 2013), e alterações morfológicas em eritrócitos de suínos, caracterizada pela perda da biconcavidade e formação de equinócitos (PATEL et al., 2013).

A hemoglobina livre apresenta um aumento durante o armazenamento resultante da ruptura das hemácias e/ou liberação da hemoglobina presente em microvesículas na membrana (ORLOV; KARKOUTI, 2015). A hemólise é a forma mais aguda de dano da membrana eritrocitária (WARDROP et al., 1994). Dentre os critérios definidos para garantir segurança na utilização da bolsa de sangue armazenada em humanos, a quantidade de hemólise deve ser <1%. O cálculo da porcentagem de hemólise segue a fórmula preconizada por Wardrop et al. (1994):

$$\% \text{ hemólise} = (100 - \text{VG}) \times \text{hemoglobina plasmática} / \text{hemoglobina total}$$

4.5.2 Alterações hemogasométricas

As alterações hemogasométricas ocorrem devido ao armazenamento por refrigeração e a glicólise reduzida e o aumento do estresse oxidativo, causando efeitos profundamente deletérios sobre a membrana eritrocitária (ORLOV; KARKOUTI, 2015).

Além dos próprios anticoagulantes das bolsas de sangue serem ácidos, com pH entre 5 e 6 nas soluções CPDA-1 e entre 4 e 6 nas soluções CPDA/SAG-M (BRASIL, 2014), ao longo do tempo de armazenamento dos eritrócitos observa-se a redução gradativa do pH, devido ao

metabolismo anaeróbico das hemácias que produz ácidos, principalmente o ácido láctico, levando ao acúmulo de íons H^+ (NIINISTÖ et al., 2008). Os ácidos finais do metabolismo anaeróbico são transportados através da membrana dos eritrócitos, acumulado-se na bolsa de sangue que é um sistema de armazenamento fechado, promovendo um declínio correspondente no pH (SOUZA et al., 2013). A administração de concentrado de hemácias, a depender do grau de acidez, pode não atingir o nível esperado de oxigenação tecidual devido à consequente diminuição das concentrações de 2,3-DPG induzida pela diminuição pH (KISIELEWICZ; SELF, 2014).

O bicarbonato (HCO_3^-) plasmático tem papel tamponante no meio extracelular de neutralizar a acidez. Porém, o aumento nos níveis de lactato ocorre ao longo do período de armazenamento levando a redução gradual nos níveis de HCO_3^- plasmático e maior acúmulo de CO_2 e, conseqüentemente, da pressão de dióxido de carbono (pCO_2) (ORLOV; KARKOUTI, 2015).

A pCO_2 é uma variável hemogasométrica que tende a aumentar no interior das bolsas de sangue ao longo do período de armazenamento, principalmente por neutralizar o ácido láctico produzido pelo metabolismo celular, pois a reação de neutralização do ácido láctico pelo bicarbonato resulta na produção de água e gás carbônico (TAVARES et al., 2011).

A pressão parcial de oxigênio (pO_2) também tende a aumentar no interior das bolsas por estas serem permeáveis à entrada e saída do CO_2 e do O_2 durante o armazenamento (COSTA JÚNIOR et al., 2008). A pO_2 e a saturação de oxigênio (SpO_2) estão interligadas por relação direta, em que o aumento da pO_2 se reflete em aumento da SpO_2 . O aumento da SpO_2 também está associada à afinidade do oxigênio à hemoglobina, estando relacionada à dissociação da mesma, que é influenciada pelo pH e o CO_2 por promoverem a liberação do O_2 ligado (SCOTT & STOCKHAM, 2011).

4.5.3 Alterações bioquímicas

A manutenção da integridade dos eritrócitos depende da disponibilidade de ATP para fornecer energia para a fosforilação de glicose e carboidratos adicionais; fosforilação das proteínas da membrana e bombear pequenas moléculas para fora da célula contra um gradiente (SCOTT & STOCKHAM, 2011; WARDROP et al., 1994).

Para a nutrição e a manutenção da integridade dos eritrócitos durante o armazenamento, é necessário uma fonte de glicose para o prolongamento do tempo de armazenamento (HÖGMAN, 1998). A glicose é necessária para operar na bomba de Na^+/K^+ , caso contrário o

potássio pode extravasar para o plasma e produzir uma pseudo-hipercalcemia antes da hemólise ficar visivelmente evidente (NIINISTÖ et al., 2008).

A glicólise contínua, no entanto, resulta na acumulação de seu subproduto primário, o lactato, no sobrenadante (KRIEBARDIS et al., 2007). O lactato é excretado pelos eritrócito *in vivo* e metabolizado pelo fígado, no entanto, durante o armazenamento do concentrado de hemácias, o lactato se concentra dentro da bolsa plástica de armazenamento, promovendo a diminuição do pH e tornando o meio ácido, no qual inibe a glicólise através de um “loop de feedback negativo”, resultando em uma redução progressiva nos níveis de ATP, 2,3-DPG e NADH (FLATT et al., 2014).

O ATP e o 2,3-DPG também são esgotados durante o armazenamento, em grande parte devido a níveis de pH extremamente baixos causados por um aumento do ácido pirúvico e, principalmente, ácido láctico. A perda de 2,3-DPG é um efeito vinculado ao pH. O acúmulo do ácido láctico na bolsa de sangue acarreta a diminuição do pH das hemácias e, conseqüentemente, resulta na diminuição do 2,3-DPG (HÖGMAN, 1998; ZUBAIR, 2010). Além disso, o acúmulo do lactato dentro do eritrócito induz a uma maior fragilidade osmótica e, conseqüentemente, a hemólise (MUDGE et al., 2004).

O 2,3-DPG em eritrócitos também desempenha um papel importante nas transfusões, uma vez que liga o oxigênio à hemoglobina. Embora a perda da capacidade de ligação seja reversível algumas horas após a transfusão, o 2,3-DPG precisa estar presente em casos agudos de perda de sangue, para haver liberação maior e mais rápida de oxigênio para o tecido (KORTE et al., 2008; NIINISTÖ et al., 2008).

O potássio é um íon predominantemente intracelular, sendo encontrado apenas cerca de 2% no meio extracelular, enquanto o sódio é um íon extracelular. A manutenção desse gradiente de concentração nas hemácias é realizada através da bomba de Na^+/K^+ presente na membrana plasmática. A atividade da bomba de Na^+/K^+ depende dos níveis de ATP, além de também influenciada pela diminuição do pH e da temperatura (OBRADOR et al., 2015). Existem diferenças no transporte de cátions e subseqüentemente nas concentrações de Na^+ e K^+ intracelulares entre as espécies. As espécies que possuem altas concentrações de K^+ intracelular (cavalo, porco e alguns ruminantes) possuem uma bomba mais ativa de Na^+/K^+ , através da hidrólise de ATP, comparados com as demais espécies que, conseqüentemente, possuem eritrócitos com teor de sódio e permeabilidade K^+ passiva maiores (LANEVSCHI; WARDROP, 2001).

Durante o armazenamento, a bomba de Na^+/K^+ falha progressivamente e o potássio intracelular extravasa da célula. A entrada do sódio e o extravasamento do potássio nos

eritrócitos, durante o armazenamento, ocorre não só porque a bomba Na^+/K^+ presentes na membrana não funcionam devidamente em condições de empobrecimento de ATP, mas também porque o resfriamento paralisa as bombas de íons (D'ALESSANDRO et al., 2010). A mudança de eletrólito mais dramática em equinos é o aumento no potássio sérico por essa espécie conter níveis intracelulares elevados de potássio (SPEAKE, 1997), podendo variar em média entre 79,5 a 97,5 mmol/litro (MUYLLE et al., 1984).

O acúmulo significativo de potássio em produtos sanguíneos armazenados provenientes de cães e felinos é improvável por estes animais possuírem baixa atividade da bomba Na^+/K^+ . No entanto, existe algumas raças de cães e espécies de animais, como os equinos, que possuem fisiologicamente altas concentrações de potássio nas hemácias, devido a atividade significativamente alta da bomba Na^+/K^+ . Segundo alguns autores (MUDGE et al., 2004; OBRADOR et al., 2015) o armazenamento prolongado de sangue obtido destes animais pode estar associado ao acúmulo de altas concentrações de potássio no sobrenadante. Embora as alterações no potássio, pH e lactato serem estatisticamente significativas em sangue de equino após apenas uma a duas semanas de armazenamento, é improvável que essas alterações tenham implicações clínicas durante transfusões de pequeno volume ou transfusões para pacientes metabolicamente estáveis (MUDGE et al., 2004; NIINISTÖ et al., 2008; OBRADOR et al., 2015). No entanto, pode haver sérias reações, ou mesmo fatal, em transfusões de maior volume ou de infusão rápida em pacientes neonatos, geriátricos ou em pacientes com comprometimento renal ou hepático (BROWN e VAP, 2015). Em pacientes de risco, os níveis de potássio e pH no sangue armazenado devem ser avaliados antes da transfusão, além da necessidade de monitorização durante a administração de sangue (MUDGE et al., 2004; BROWN e VAP, 2015).

4.5.4 Contaminação bacteriana

Quanto à esterilidade, as bolsas plásticas não devem apresentar crescimento microbiano quando submetidas ao ensaio (BRASIL, 2014). A preparação de componentes sanguíneos de qualidade requer grande cuidado e atenção aos detalhes no protocolo adequado na manipulação das bolsas de sangue. As condições assépticas devem ser mantidas em todos os procedimentos desde a coleta de sangue a transfusão (KUMAR, 2017). O sangue, além de ser uma fonte potencial de infecção por uma variedade de agentes transmissíveis, é um excelente meio de cultura bacteriana, sendo, atualmente, a contaminação bacteriana dos produtos

sanguíneos a maior fonte de doença transmitida por transfusão em humanos (BRECHER; HAY, 2005; HESS, 2010).

Dentre as possíveis fontes de contaminação bacteriana dos componentes sanguíneos incluem: bacteremia do doador, contaminação durante o procedimento de coleta do sangue total, contaminação da bolsa para coleta e contaminação durante o procedimento e processamento do sangue (HILLYER et al., 2003). No entanto, a baixa temperatura de armazenamento do concentrado de hemácias reduz a proliferação da maioria das espécies de bactérias, por não sobreviverem ao armazenamento no frio (HILLYER et al., 2003; HESS, 2010). Porém, existem bactérias tolerantes, como as do gênero *Aeromonas*, *Vibrio* e *Serratia*, que podem sobreviver e crescer lentamente nas temperaturas utilizadas para armazenar concentrado de hemácias. Essas espécies dividem-se apenas um pouco mais de uma vez por dia, de modo que normalmente leva pelo menos 19 dias para uma bactéria se multiplicar em até as 10⁸ unidades, podendo causar um evento séptico grave em humano (HESS, 2010). Há relatos de óbito envolvendo infecção por bactérias *Yersinia enterocolitica*, *Serratia liquefaciens* e uma variedade de gram negativas (BRECHER; HAY, 2005).

As medidas que reduzem a incidência de transfusão de unidades contaminadas incluem, além do processamento do produto e os procedimentos de prática transfusional, a inspeção visual da bolsa antes de sua utilização para transfusão. A inspeção visual é importante, pois notar um escurecimento evidente no concentrado de hemácias pode estar associado ao consumo de oxigênio por bactérias ou excesso de hemólise devido a enzimas bacterianas (HESS, 2010). A contaminação bacteriana promove, além do risco de infecção ao receptor, a redução do prazo de validade no armazenamento da bolsa de sangue, pois a proliferação bacteriana pode contribuir para uma diminuição do pH e aumento do lactato (MUDGE et al., 2004).

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia, protocolado sob o número 26/2017.

5.1 DOADORES

Foram selecionados 15 equinos do Esquadrão da Polícia Montada da Bahia, adultos entre um a 19 anos (idade), machos e fêmeas, entre 400 a 530 kg, das raças BH (Brasileiro de Hipismo), PSL (Puro Sangue Lusitano) e SRD (Sem Raça Definida), sendo todos os animais com histórico de comportamento dócil. Os 15 equinos foram submetidos a exames clínicos, segundo preconizado por Speirs (1997), realizados por um médico veterinário especializado em clínica de equinos, 15 dias antes das coletas das bolsas de sangue. Neste período, foram coletados 4mL de sangue em EDTA, para realização de exames hematológicos (eritrograma, leucograma e plaquetograma), os quais foram processados no Laboratório de Pesquisa de Hematologia e Bioquímica Clínica (EMEVZ) do Hospital de Medicina Veterinária Renato Rodenburg de Medeiros Neto – HOSPMEV/UFBA. A realização desses exames teve como objetivo avaliar a higidez dos animais para posteriormente selecionar 10 animais como doadores a serem incluídos no presente estudo.

Os animais utilizados nesta etapa permaneceram em sistemas de manejo padrão de rotina do Esquadrão da Polícia Montada da Bahia, em baias individuais, com a alimentação no cocho à base de feno de capim Tifton (*Cynodon sp.*), concentrado comercial (1-2% do peso corporal, dividido em três refeições diárias), além de água à vontade e suplemento mineral (Figura 5). Todos os equinos eram submetidos ao mesmo esquema sanitário profilático de acordo com a rotina do Esquadrão da Polícia Montada da Bahia, incluindo-se o controle de parasitos gastrointestinais, ectoparasitos, além de vacinações contra raiva, tétano, encefalomielite equina e influenza equina.

Figura 5: Fotografia ilustrativa de um equino do Esquadrão da Polícia Montada da Bahia em baia individual.



Fonte: ESQUADRÃO DA POLÍCIA MONTADA DA BAHIA (2018).

5.1.1 Critério de exclusão

Dos 15 animais avaliados cinco foram excluídos por estarem amamentando, com escore corporal <3 , na escala de 1- 4 de acordo com Speirs (1997), e/ou com o volume globular inferior a 32%, de acordo com valores dos componentes do eritrograma determinados por Weiss e Wardrop (2010). Por fim, 10 equinos foram selecionados como doadores. A tabela da ficha clínica resumida e do resultado do hemograma dos 15 animais estão apresentadas nos Anexos 1 e 2, respectivamente.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

De cada um dos 10 equinos incluídos no experimento, o sangue foi colhido por venipunção da jugular externa tendo antes realizado a antissepsia regional, em dois tipos de bolsas de sangue humano (JP Farma®), a CPDA-1e a CPD/SAG-M, cuja composição das soluções anticoagulante preservadora encontram-se apresentadas no Quadro 1, totalizando 20 bolsas de sangue. Cada bolsa continha em média 420mL de sangue, as quais foram pesadas durante a coleta em um homogeneizador automático (Compomixer®).

Após a colheita, as bolsas foram imediatamente acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo reciclável, tomando-se o cuidado para não haver o contato direto destas com o

gelo e, em seguida, foram transportadas para o Hospital Veterinário da Universidade Federal da Bahia (UFBA), onde foram armazenadas em um refrigerador do modelo Indrel® e mantidas em temperatura entre 2 a 6°C.

Quadro 1: Componentes das soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M onde foram acondicionados o sangue dos equinos.

| Solução CPDA-1 | |
|--|--------|
| Solução CPDA-1 (63mL) | |
| Citrato de Sódio diidratado..... | 2630mg |
| Ácido Cítrico Anidro..... | 300mg |
| Fosfato de Sódio Monobásico monohidratada..... | 222mg |
| Dextrose Anidra USP..... | 2900mg |
| Adenina..... | 27,5mg |
| Água para injetáveis q.s.p..... | 100mL |
| Solução CPD/SAG-M | |
| Solução CPD (63mL): | |
| Citrato de Sódio diidratado..... | 2630mg |
| Ácido Cítrico Anidro..... | 300mg |
| Fosfato de Sódio Monobásico monohidratado..... | 222mg |
| Glicose monohidratada..... | 2550mg |
| Água para injetáveis q.s.p..... | 100mL |
| Solução Sag Manitol 1 (100mL) | |
| Glicose monohidratada..... | 900mg |
| Manitol..... | 525mg |
| Adenina..... | 17mg |
| Cloreto de Sódio..... | 877mg |
| Água para injetáveis q.s.p..... | 100mL |

Fonte: JP Farma®, 2018.

A centrifugação das bolsas, para separação do concentrado de hemácias do plasma, foi realizada 24 horas após a coleta, utilizando uma centrífuga de bolsa de sangue (Heraeus Cryofuge 5500i®), configurada para uma rotação 3000forçag por 7 minutos. As bolsas foram devidamente identificadas e organizadas em 2 grupos (G1 e G2); no grupo 1 foram incluídas as bolsas do tipo CPDA-1 e no grupo 2 as bolsas do tipo CPD/SAG-M. No concentrado de hemácias do grupo 2, foi adicionado 100mL da solução preservativa Sag manitol (SAG-M),

presente em uma bolsa acessória, por meio de ruptura do lacre e transferência por gravidade, resultando em um concentrado de hemácias diluído, conforme as instruções do fabricante contidas na embalagem das bolsas.

Durante a manipulação das 20 bolsas de sangue, foram descartadas três por falha técnica, totalizando no experimento oito bolsas do grupo CPDA-1 e nove bolsas do grupo CPD/SAG-M, utilizando no estudo ao todo 17 bolsas de sangue.

Para a avaliação dos concentrados de hemácias foram colhidas alíquotas de cada uma das bolsas, para realização de exames hematológicos, bioquímicos e hemogasométricos. Os exames hematológicos e bioquímicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Hematologia e Bioquímica Clínica (EMEVZ), e as hemogasometrias foram realizadas no Hospital Veterinário SEMEVE.

As avaliações laboratoriais foram realizadas semanalmente, iniciando-se 24 horas após a coleta das bolsas de sangue (momento D1), após a separação do concentrado de hemácias do plasma, com exceção de algumas análises hematológicas (número de hemácias, VCM e CHCM) as quais foram realizadas em analisador hematológico automático, que iniciaram 8 dias após a coleta (D8), até 36 dias após a coleta (D36), quando se concluiu o experimento. Ao todo, foram 36 dias de experimento após a coleta das bolsas de sangue e 35 dias de armazenamento do concentrado de hemácias (Quadro 2).

Quadro 2: Tempos experimentais em que foram realizadas as análises laboratoriais das amostras do concentrado de hemácias de equinos armazenadas, distribuídos por parâmetros.

| Tempo (dias) | Momento da avaliação | Nº hemácias, VCM, CHCM | VG, Hg livre, Hemólise | pH, PO ₂ , PCO ₂ , SpO ₂ , HCO ₃ ⁻ | Glicose, Lactato, K ⁺ | Cultura bacteriana |
|--------------|------------------------|------------------------|------------------------|---|----------------------------------|--------------------|
| D1 | 24 horas após a coleta | | x | x | x | |
| D8 | 8 dias após a coleta | x | x | x | x | x |
| D15 | 15 dias após a coleta | x | x | x | x | |
| D22 | 22 dias após a coleta | x | x | x | x | x |
| D29 | 29 dias após a coleta | x | x | x | x | |
| D36 | 36 dias após a coleta | x | x | x | x | X |

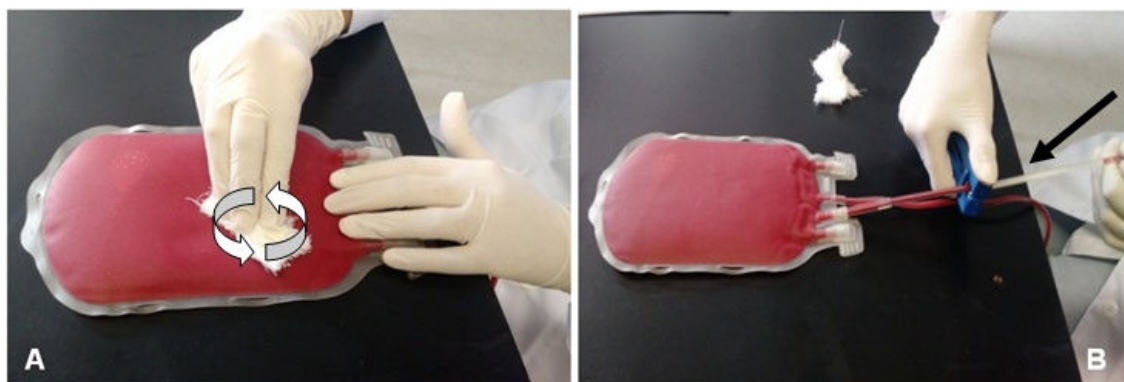
Fonte: COSTA (2008).

Para controle de qualidade dos concentrados de hemácias armazenados foram obtidas alíquotas sem contato com ar do tubo de coletadas bolsas nos dias 7, 21 e 35 de armazenamento, e enviadas para o Laboratório de Bacterioses da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, para realização de cultura bacteriana, onde foram submetidas à cultura em aerobiose e anaerobiose, de acordo com as técnicas preconizadas pela CLSI (2005) e ANVISA (2013).

5.3 ALIQUOTAGEM DAS AMOSTRAS

Para obtenção das alíquotas, as bolsas de concentrado de hemácias foram homogeneizadas delicadamente (Figura 6) com o auxílio de gaze. Em seguida, os manguitos foram ordenhados de 3 a 5 vezes no sentido retrógado para homogeneizar o sangue da tubulação.

Figura 6: Fotografias ilustrativas da homogeneização (setas brancas indicando o movimento circular) realizada nas bolsas de concentrado de hemácias de equinos antes de obter a alíquota das mesmas (A) e a homogeneização retrógada na tubulação (seta preta), com auxílio de um alicate de ordenha para bolsa de sangue (B).



Fonte: COSTA (2018).

Após a homogeneização do manguito, a extremidade distal era cortada (Figura 7) e cerca de 5 mL de sangue eram desprezados a fim de lavar a tubulação com o sangue de dentro da bolsa. Em seguida, foram separados 5mL em tubo de amostra para as análises hematológica e bioquímica, procedendo com a selagem dupla da ponta final da tubulação, com cerca de 3cm, para manter uma pequena porção sem contato direto com ar a ser destacado (Figura 8) e enviado para realizar a hemogasometria (Figura 9).

Figura 7: Fotografias ilustrativas do corte distal à bolsa de sangue (seta preta), para lavagem da tubulação com o sangue homogeneizado (C) e demonstração da utilização da máquina seladora (D).



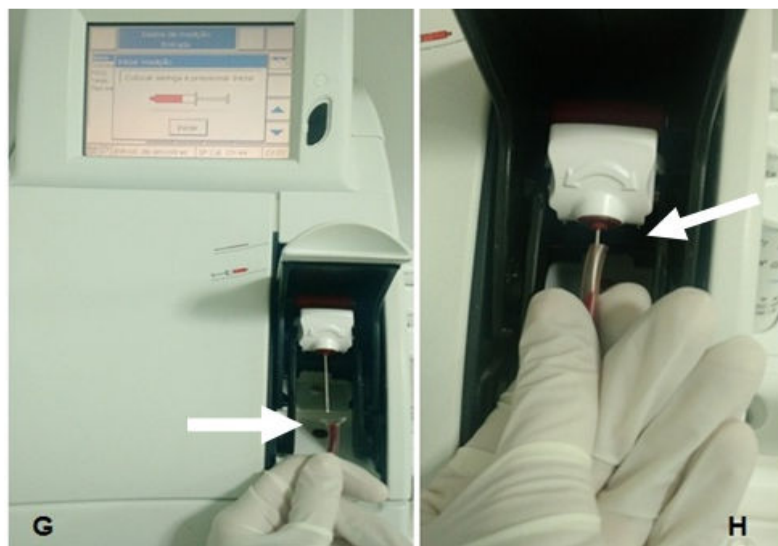
Fonte: COSTA (2018).

Figura 8: Fotografias demonstrativas das alíquotas obtidas da tubulação da bolsa de sangue após a selagem (Foto E). A porção mais distal é descartada por haver contato direto com o ar (seta). Duas alíquotas destacadas da tubulação da bolsa de sangue (Foto F).



Fonte: COSTA (2018).

Figura 9: Fotografias ilustrativas da manipulação da alíquota destacada da tubulação da bolsa de sangue (seta branca), sem contato direto com o ar (Foto G). Uma extremidade da alíquota era cortada no momento de introduzir a amostra (seta branca) no hemogasômetro (Foto H).



Fonte: COSTA (2018).

No momento da obtenção das alíquotas, as bolsas de sangue ficaram armazenadas em caixa de isopor contendo gelo reciclável. Ao término das aliquotagens, as bolsas eram armazenadas novamente na geladeira. Estes procedimentos foram repetidos a cada sete dias e as bolsas eram retiradas da refrigeração, antes de serem manipuladas, de forma aleatória.

5.4 ANÁLISES DAS AMOSTRAS

As alíquotas de 5,0mL foram fracionadas para a realização dos exames hematológicos e bioquímicos. Foram separadas alíquotas de 1,0mL para: a avaliação o volume globular, pela técnica do microhematócrito, segundo preconizado por Weiss e Wardrop (2010); para a realização os exames hematológicos (contagem do número de hemácias, VCM, CHCM) no aparelho hematológico Poch (Roche®) onde foram diluídos 0,3 mL das amostras em 1:2 de solução salina para diminuir a viscosidade e não danificar o equipamento, os resultados obtidos das contagens foram corrigidos multiplicando o resultado do fator por 2; e foram determinadas as concentrações da hemoglobina total e livre pelo método da cianometahemoglobina em espectrofotômetro (Bioplus 2000®), utilizando reagente da marca Doles®.

O cálculo do grau de hemólise foi realizado pelo valor do VG da bolsa, concentração de hemoglobina total do hemocomponente homogeneizado e a concentração de hemoglobina livre (plasmática) (WARDROP et al.,1994):

$$\text{Porcentagem de Hemólise (\%)} = (100 - \text{VG}) \times \frac{\text{Hemoglobina Plasmática (g/dL)}}{\text{Hemoglobina Total (g/dL)}}$$

Os 4,0 ml restantes foram centrifugados e os sobrenadantes obtidos foram utilizados para realizar as análises bioquímicas, em analisador semiautomático (Bioplus 2000®). As concentrações de glicose foram determinadas pelo método enzimático, utilizando reagentes da marca Doles® com a metodologia glicose oxidase e as concentrações de lactato foram determinadas pelo método enzimático, utilizando reagentes da marca Bioclin® com a metodologia lactato desidrogenase. Para realizar as mensurações de potássio utilizou-se um espectrofotômetro de chama (Tecnow 700®).

As variáveis hemogasométricas mensuradas foram: potencial hidrogeniônico (pH), saturação de oxigênio (SpO₂), pressão parcial de oxigênio (PO₂), pressão parcial de dióxido de carbono (PCO₂) e bicarbonato (HCO₃⁻), através do analisador de pH e gases sanguíneos Cobas b 121 (Roche®).

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O efeito do tempo (D1, D8, D15, D22, D29 e D36) para cada tipo de bolsa de sangue (CPDA-1 e CPD/SAG-M) foi avaliado como medidas repetidas no tempo e os valores médios de cada parâmetro, em cada momento, foram comparados pelo teste Tukey-Kramer. As análises foram feitas usando o PROC MIXED do programa estatístico SAS 9.1®.

Foram calculadas as mudanças proporcionais, em valores percentuais, para os parâmetros VCM, CHCM, VG, pH, PO₂, PCO₂, SpO₂, HCO₃⁻, glicose e lactato, entre o dia da primeira análise, de cada parâmetro, e a quinta semana de armazenamento. Os valores percentuais de alteração entre o tipo de bolsa foram submetidos à análise de variância.

Os parâmetros hemoglobina livre, grau de hemólise, potencial hidrogeniônico (pH), pressão parcial de oxigênio (PO₂), pressão de dióxido de carbono (PCO₂), saturação de oxigênio (SpO₂), bicarbonato (HCO₃⁻), glicose, lactato e potássio (K⁺) foram submetidos ao teste de correlação de Pearson pelo PROC CORR do SAS 9.1®. As significâncias das análises foram declaradas quando P<0,05.

6. RESULTADOS

Os resultados deste estudo foram representados em grupos de análises hematológicas, hemogasométricas e bioquímicas. As análises estão apresentadas através de médias e desvios padrão obtidos nos períodos D1 (24 horas após coleta), D8 (8 dias após coleta), D15 (15 dias após coleta), D22 (22 dias após coleta), D29 (29 dias após coleta) e D36 (36 dias após coleta) de armazenamento das bolsas contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M, as quais realizaram avaliação estatística para verificar o efeito do tempo sobre os parâmetros analisados, além da variação percentual dos resultados das médias finais quando comparado com as iniciais. Para os resultados dos parâmetros submetidos ao teste de Pearson, foram destacados aqueles que apresentaram intensa e moderada correlação.

As culturas bacterianas de todas as bolsas de sangue, realizadas com o objetivo de controle de qualidade do armazenamento das bolsas de sangue, apresentaram resultados negativos em todos os momentos que foram submetidos a esta análise de acordo como as exigências do Artigo 53 da Resolução nº35, de 12 de junho de 2014 do Ministério da Saúde. Sendo assim, nenhuma bolsa de sangue foi excluída do estudo, durante o experimento, por contaminação bacteriana.

6.1 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

Os parâmetros hematológicos analisados nas bolsas CPDA-1, que apresentaram variação significativamente estatística ($P < 0,05$) em função do tempo de armazenamento, foram: VCM, CHCM, VG e hemoglobina livre.

Os parâmetros hematológicos analisados nas bolsas CPD/SAG-M, que apresentaram variação estatística significativamente ($P < 0,05$) em função do tempo de armazenamento, foram: número de hemácias, VCM, CHCM, VG, hemoglobina livre e grau de hemólise.

Os resultados das análises hematológicas foram apresentados na Tabela 1 e Figuras de 10 a 15.

Tabela 1. Médias e desvios padrões obtidas das análises hematológicas durante o tempo de armazenamento (dias) referente às bolsas CPDA-1 e CPDA/SAG-M de concentrado de hemácias de equinos.

| Parâmetros | Tempo de armazenamento (dias) após a coleta das bolsas de sangue | | | | | |
|-------------------------------------|--|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | D1 | D8 | D15 | D22 | D29 | D36 |
| Hemácias(x10⁶/μl) | | | | | | |
| CPDA-1 | - - | 15,69 ± 0,97 ^a | 15,7 ± 1,23 ^a | 15,82 ± 1,82 ^a | 15,68 ± 1,00 ^a | 15,14 ± 0,57 ^a |
| SAG-M | - - | 12,2 ± 0,43 ^{ab} | 12,32 ± 0,4 ^a | 11,55 ± 0,93 ^b | 12,48 ± 0,31 ^a | 12,11 ± 0,38 ^{ab} |
| VCM (fL) | | | | | | |
| CPDA-1 | - - | 46,28 ± 2,01 ^d | 46,65 ± 2,11 ^d | 48,15 ± 2,79 ^c | 49,49 ± 3,24 ^b | 51,16 ± 3,36 ^a |
| SAG-M | - - | 46,6 ± 2,03 ^d | 47,07 ± 2,19 ^d | 48,24 ± 2,45 ^c | 48,9 ± 2,56 ^b | 49,58 ± 2,54 ^a |
| CHCM (g/dL) | | | | | | |
| CPDA-1 | - - | 32,24 ± 1,05 ^a | 32,06 ± 1,12 ^a | 31,1 ± 1,43 ^b | 30,28 ± 1,37 ^c | 29,64 ± 1,63 ^d |
| SAG-M | - - | 32,38 ± 0,95 ^a | 31,66 ± 1,02 ^b | 31,02 ± 1,34 ^{bc} | 30,36 ± 1,32 ^c | 30,11 ± 1,48 ^c |
| VG (%) | | | | | | |
| CPDA-1 | 71,38 ± 2,33 ^b | 72 ± 1,69 ^b | 74,38 ± 2,39 ^b | 74,88 ± 5,74 ^b | 80 ± 3,38 ^a | 82,88 ± 5,08 ^a |
| SAG-M | 58 ± 2,06 ^c | 59,11 ± 4,48 ^{bc} | 62,33 ± 3,08 ^{abc} | 65 ± 6,52 ^a | 64,78 ± 2,82 ^a | 63,78 ± 2,91 ^{ab} |
| Hg livre (g/dL) | | | | | | |
| CPDA-1 | 0,13 ± 0,11 ^b | 0,24 ± 0,22 ^{ab} | 0,34 ± 0,07 ^{ab} | 0,35 ± 0,15 ^{ab} | 0,4 ± 0,16 ^a | 0,45 ± 0,18 ^a |
| SAG-M | 0,04 ± 0,04 ^c | 0,13 ± 0,06 ^b | 0,22 ± 0,05 ^a | 0,23 ± 0,04 ^{ab} | 0,25 ± 0,06 ^a | 0,29 ± 0,12 ^a |
| Hemólise (%) | | | | | | |
| CPDA-1 | 0,11 ± 0,08 ^a | 0,22 ± 0,2 ^a | 0,26 ± 0,05 ^a | 0,27 ± 0,11 ^a | 0,28 ± 0,13 ^a | 0,29 ± 0,16 ^a |
| SAG-M | 0,07 ± 0,08 ^c | 0,22 ± 0,1 ^b | 0,32 ± 0,08 ^{ab} | 0,34 ± 0,09 ^{ab} | 0,38 ± 0,09 ^a | 0,46 ± 0,18 ^a |

Fonte: COSTA (2018).

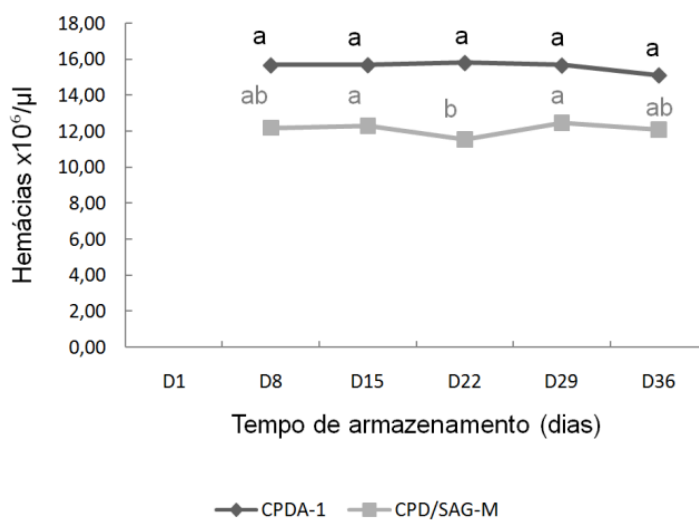
Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com P<0,05.

6.1.1 Número de hemácias

Os valores de média do número de hemácias das bolsas CPDA-1 não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$) entre os tempos analisados.

As médias dos números de hemácias das bolsas CPD/SAG-M nos tempos analisados, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$) no momento D22 quando comparada aos momentos D15 e D29 (Figura 10).

Figura 10: Representação gráfica da variação no número de hemácias por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



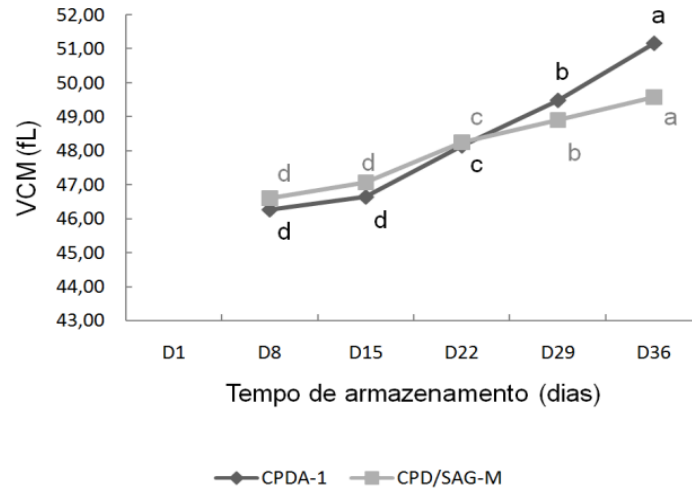
Fonte: COSTA (2018).

Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P<0,05$.

6.1.2 Volume corpuscular médio (VCM)

O valor da média do volume corpuscular médio (VCM) apresentou aumento gradativo nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M, com diferença estatística ($P<0,05$) a partir do momento D15 ao D36 de armazenamento (Figura 11).

Figura 11: Representação gráfica da variação no volume corpuscular médio (VCM) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



Fonte: COSTA (2018).

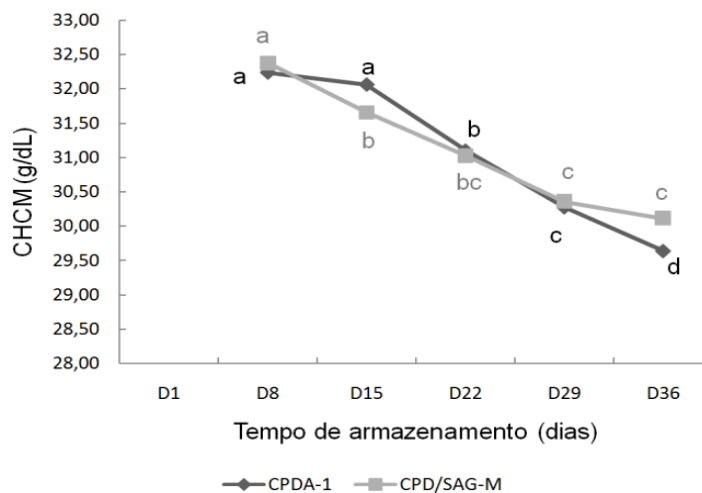
Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.1.3 Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

O valor da média da hemoglobina corpuscular média (CHCM) das bolsas CPDA-1 apresentou diminuição gradativa, com diferença estatística ($P < 0,05$), a partir do momento D15 ao D36 de armazenamento.

A CHCM das bolsas CPD/SAG-M apresentou diminuição gradativa, com diferenças estatísticas ($P < 0,05$) nos momentos D8, D15 e D29, de armazenamento (Figura 12).

Figura 12: Representação gráfica da variação na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



Fonte: COSTA (2018).

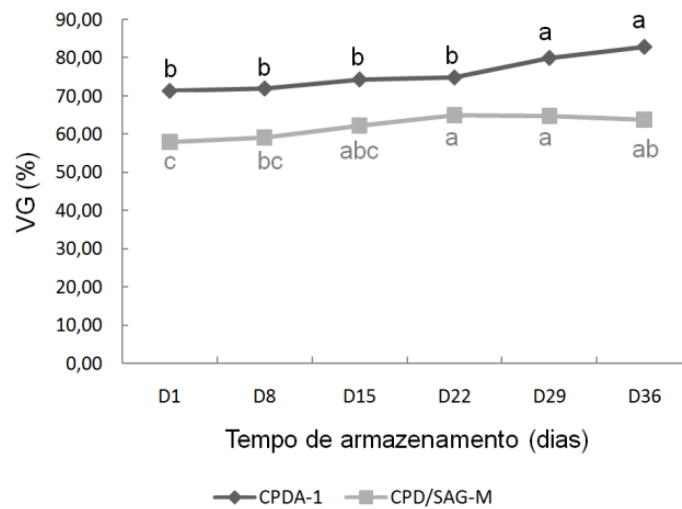
Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.1.4 Volume globular (VG)

O valor da média do volume globular (VG) nas bolsas CPDA-1 apresentou um aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) a partir do momento D22 ao D29 e, em seguida, manteve-se sem diferença estatística entre os momentos D29 e D36.

O valor da média do VG das bolsas CPD/SAG-M apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) a partir do momento D15 ao D22, quando comparado ao D1, havendo estabilização das médias entre D22 e D29, com uma discreta diminuição não significativa do D29 ao D36 de armazenamento (Figura 13).

Figura 13: Representação gráfica da variação do volume globular (VG) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



Fonte: COSTA (2018).

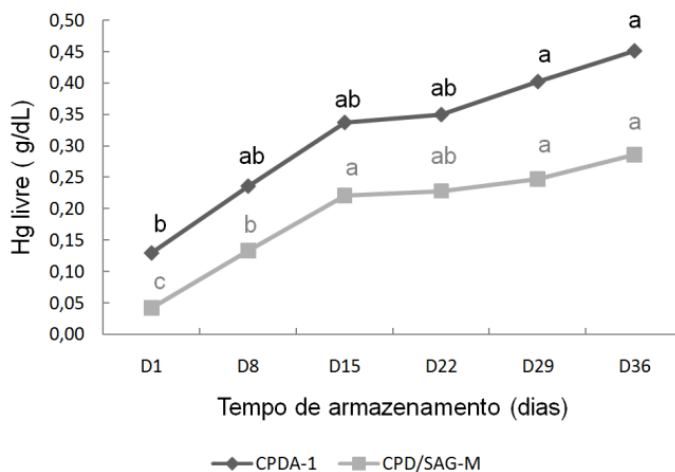
Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.1.5 Hemoglobina Livre

O valor da média da hemoglobina livre nas bolsas CPDA-1 apresentou um aumento gradativo com diferença estatística ($P < 0,05$) a partir do momento D22 ao D29 e, em seguida, sem diferença estatística entre os momentos D29 e D36.

O aumento da hemoglobina livre nas bolsas CPD/SAG-M apresentou um aumento gradativo com diferença estatística ($P < 0,05$) a partir do momento D1 ao D15. Em seguida, os valores das médias não apresentaram diferenças estatísticas entre os momentos D15 e D36 (Figura 14).

Figura 14: Representação gráfica da variação da hemoglobina livre por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



Fonte: COSTA (2018).

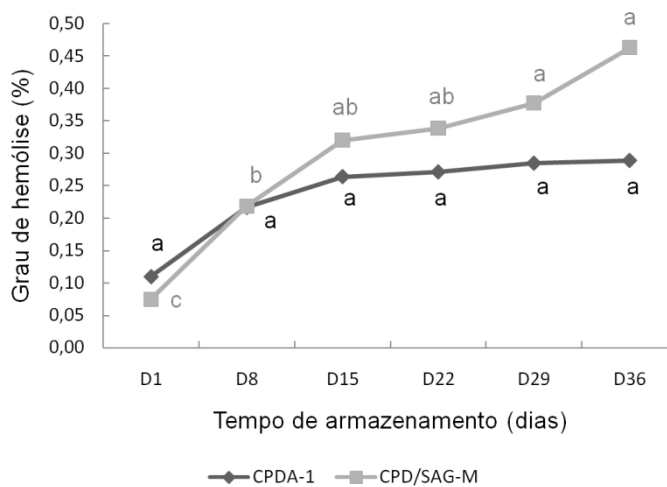
Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.1.6 Grau de hemólise

Os valores de média do grau de hemólise das bolsas CPDA-1 diminuíram gradativamente do momento D1 até o D36 de armazenamento, entretanto não foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$).

O grau de hemólise das bolsas CPD/SAG-M apresentou aumento gradativo, com diferença estatística ($P < 0,05$), a partir dos momentos D1 ao D8 e D22 e D29, com os valores das médias sem diferença estatística entre D29 e D36 de armazenamento (Figura 15).

Figura 15: Representação gráfica da variação do grau de hemólise por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



Fonte: COSTA (2018).

Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.2 ANÁLISES HEMOGASOMÉTRICAS

Todos os parâmetros hemogasométricos analisados nas bolsas contendo as soluções CPDA-1 e CPDA/SAG-M apresentaram variação estatística ($P < 0,05$) sobre o efeito dos momentos do período de armazenamento. Os resultados das análises hemogasométricas estão apresentados na Tabela 2 e Gráficos de 16 a 20.

Tabela 2. Médias e desvio padrão seguida por letras diferentes obtidas das análises hemogasométricas semanais referentes às bolsas CPDA-1 e CPDA/SAG-M de concentrado de hemácias de equinos.

| Parâmetros | Tempo de armazenamento (dias) após a coleta das bolsas de sangue | | | | | |
|--|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | D1 | D8 | D15 | D22 | D29 | D36 |
| pH | | | | | | |
| CPDA-1 | 6,99 ± 0,05 ^a | 6,94 ± 0,04 ^b | 6,90 ± 0,04 ^c | 6,86 ± 0,05 ^d | 6,85 ± 0,05 ^d | 6,85 ± 0,07 ^d |
| SAG-M | 6,99 ± 0,02 ^a | 6,91 ± 0,02 ^b | 6,85 ± 0,02 ^c | 6,79 ± 0,04 ^d | 6,74 ± 0,04 ^e | 6,69 ± 0,05 ^f |
| pO₂(mmHg) | | | | | | |
| CPDA-1 | 56,18 ± 5,49 ^d | 80,78 ± 20,71 ^{cd} | 103,01 ± 28,12 ^c | 150,55 ± 50,65 ^d | 163,05 ± 44,71 ^b | 214,85 ± 12,03 ^a |
| SAG-M | 58,34 ± 3,43 ^d | 94,84 ± 12,25 ^c | 112,37 ± 15,32 ^c | 164,22 ± 37,04 ^b | 177,90 ± 32,16 ^b | 220,14 ± 6,69 ^a |
| pCO₂(mmHg) | | | | | | |
| CPDA-1 | 86,38 ± 9,02 ^a | 79,46 ± 4,35 ^{ab} | 74,53 ± 5,06 ^b | 74,20 ± 8,02 ^b | 71,01 ± 5,35 ^b | 54,31 ± 8,51 ^c |
| SAG-M | 56,02 ± 2,47 ^{bc} | 56,17 ± 3,42 ^{bc} | 57,08 ± 2,68 ^{abc} | 61,72 ± 5,69 ^{ab} | 63,18 ± 7,08 ^a | 51,41 ± 6,46 ^c |
| SpO₂ (%) | | | | | | |
| CPDA-1 | 65,58 ± 4,85 ^d | 79,64 ± 6,71 ^c | 88,03 ± 5,90 ^b | 92,61 ± 6,06 ^a | 94,76 ± 3,42 ^a | 97,85 ± 0,94 ^a |
| SAG-M | 66,82 ± 4,86 ^d | 83,13 ± 5,54 ^c | 88,42 ± 4,78 ^b | 93,42 ± 5,37 ^{ab} | 94,20 ± 5,17 ^{ab} | 96,42 ± 0,54 ^a |
| HCO₃⁻(mmol/L) | | | | | | |
| CPDA-1 | 20,96 ± 1,85 ^a | 16,66 ± 2,15 ^b | 14,48 ± 1,86 ^c | 13,13 ± 1,85 ^d | 12,20 ± 1,78 ^d | 10,18 ± 2,29 ^e |
| SAG-M | 13,11 ± 0,40 ^a | 11,01 ± 0,43 ^b | 9,83 ± 0,44 ^c | 9,10 ± 0,34 ^{cd} | 8,34 ± 0,66 ^d | 6,27 ± 1,39 ^e |

Fonte: COSTA (2018).

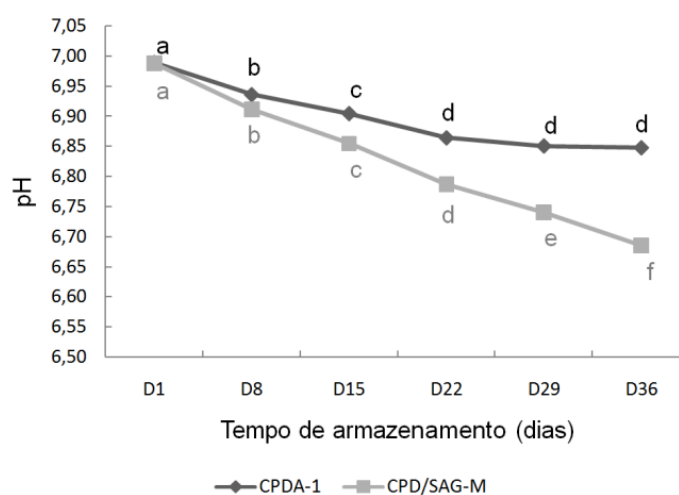
Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com P<0,05.

6.2.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

O potencial hidrogeniônico (pH) nas bolsas CPDA-1 apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) com diminuição dos valores de média a partir do momento D1 ao D15 e, em seguida, não houve diferença estatística dos valores das médias entre D22 e D36 de armazenamento.

A média do pH das bolsas CPD/SAG-M apresentou uma diminuição gradativa com diferença estatística ($P < 0,05$) em todos os momentos analisados (Figura 16).

Figura 16: Representação gráfica da variação do potencial hidrogeniônico (pH) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



Fonte: COSTA (2018)

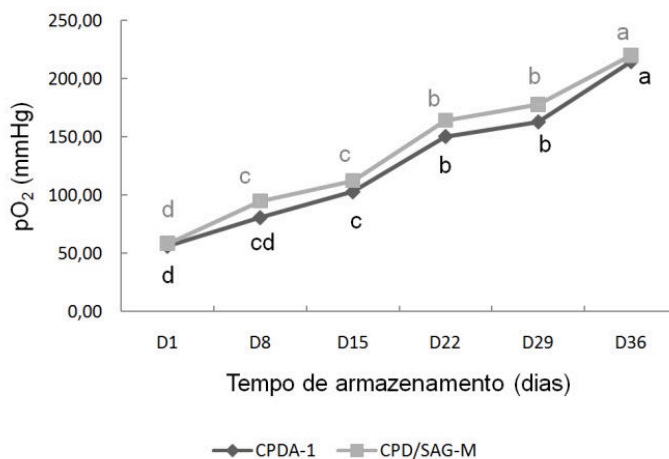
Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.2.2 Pressão parcial de oxigênio (PO₂)

A pressão parcial de oxigênio (PO₂), nas bolsas CPDA-1, apresentou um aumento gradativo, no qual foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$) a partir do momento D8 ao D22 e D29 ao D36 de armazenamento.

A pressão parcial de oxigênio (PO₂) apresentou aumento gradativo nas bolsas CPD/SAG-M, sendo estatisticamente significativo ($P < 0,05$) a partir do momento D1 ao D8, D15 ao D22 e D29 ao D36 de armazenamento (Figura 17).

Figura 17: Representação gráfica da variação da pressão parcial de oxigênio (PO_2) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



Fonte: COSTA (2018).

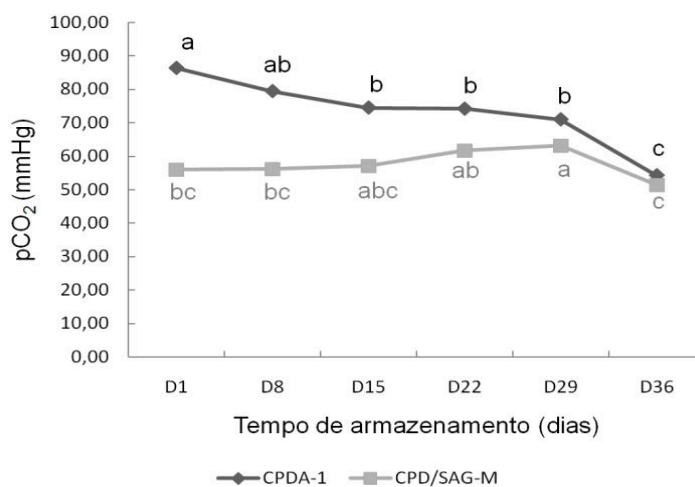
Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.2.3 Pressão de dióxido de carbono (PCO_2)

A pressão de dióxido de carbono (PCO_2) apresentou diminuição com diferença estatística ($P < 0,05$) nas bolsas CPDA-1 a partir do momento D8 ao D15 e D29 ao D36 de armazenamento.

A PCO_2 nas bolsas CPD/SAG-M apresentou inicialmente um aumento com diferença significativa ($P < 0,05$) a partir do momento D22 ao D29 e, em seguida, uma diminuição significativa ($P < 0,05$) do D29 ao D36 de armazenamento (Figura 18).

Figura 18: Representação gráfica da variação da pressão de dióxido de carbono (PCO_2) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



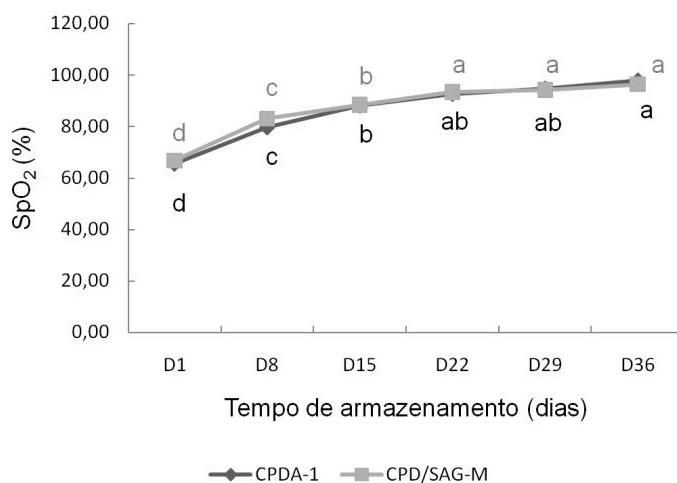
Fonte: COSTA (2018)

Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.2.4 Saturação de oxigênio (SpO_2)

A saturação de oxigênio (SpO_2), tanto nas bolsas CPDA-1 como nas CPD/SAG-M, apresentou um aumento significativo ($P < 0,05$) dos valores de médias a partir do momento D1 ao D15. Em seguida, os valores das médias não apresentaram diferença estatística a partir do momento D22 ao D36 de armazenamento (Figura 19).

Figura 19: Representação gráfica da variação da saturação de oxigênio (SpO_2) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M



Fonte: COSTA (2018).

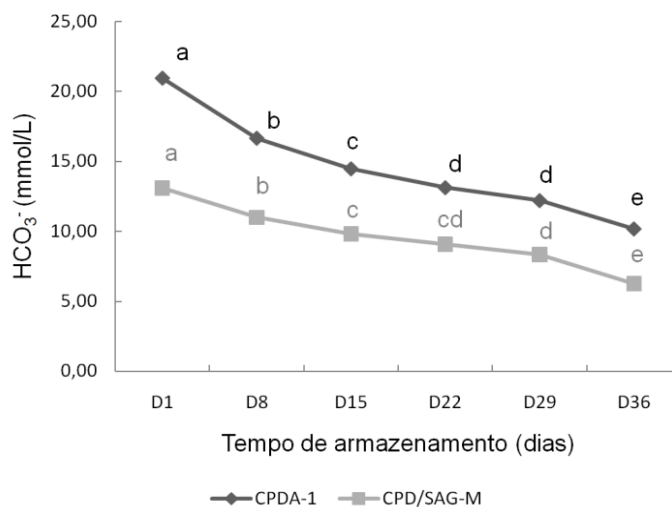
Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.2.5 Bicarbonato (HCO_3^-)

Os níveis de bicarbonato (HCO_3^-) nas bolsas CPDA-1 apresentaram uma diminuição gradativa, com diferença estatística ($P < 0,05$) a partir do momento D1 ao D22 e entre o D29 e D36 de armazenamento.

Os níveis de HCO_3^- nas bolsas CPD/SAG-M apresentaram uma diminuição com diferença estatística ($P < 0,05$) a partir do momento D1 ao D15 e D22 ao D36 de armazenamento (Figura 20).

Figura 20: Representação gráfica da variação do bicarbonato (HCO_3^-) por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



Fonte: COSTA (2018).

Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Na análise dos parâmetros bioquímicos, todas as amostras das bolsas contendo as soluções CPDA-1 e CPDA/SAG-M apresentaram variação estatística ($P < 0,05$) sobre o efeito do tempo de armazenamento. Os resultados das análises bioquímicas estão presentes na Tabela 3 e Figura 21 a 23.

Tabela 3. Médias e desvios padrões seguida por letras diferentes obtidas das análises bioquímicas semanais referentes às bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M de concentrado de hemácias de equinos.

| Parâmetros | Tempo de armazenamento (dias) após a coleta das bolsas de sangue | | | | | |
|--------------------------|--|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | D1 | D8 | D15 | D22 | D29 | D36 |
| Glicose (mg/dL) | | | | | | |
| CPDA-1 | 563,00 ± 120,11 ^a | 319,01 ± 171,61 ^b | 181,25 ± 127,79 ^c | 76,13 ± 101,24 ^d | 52,25 ± 77,55 ^d | 38,63 ± 45,87 ^d |
| SAG-M | 699,33 ± 68,72 ^a | 578,33 ± 49,40 ^b | 495,56 ± 46,44 ^c | 407,00 ± 57,97 ^d | 352,67 ± 65,18 ^{de} | 321,67 ± 66,67 ^e |
| Lactato (mmol/L) | | | | | | |
| CPDA-1 | 6,65 ± 1,20 ^e | 13,87 ± 3,30 ^d | 22,32 ± 2,27 ^b | 17,81 ± 1,13 ^c | 27,47 ± 2,07 ^a | 25,80 ± 2,02 ^a |
| SAG-M | 4,29 ± 0,60 ^e | 9,82 ± 1,55 ^d | 16,00 ± 1,53 ^b | 13,51 ± 1,62 ^c | 23,73 ± 2,97 ^a | 24,31 ± 2,5 ^a |
| Potássio (mmol/L) | | | | | | |
| CPDA-1 | 4,34 ± 1,03 ^d | 13,22 ± 2,25 ^c | 17,35 ± 1,68 ^c | 28,16 ± 4,06 ^b | 26,00 ± 2,83 ^b | 36,13 ± 7,60 ^a |
| SAG-M | 1,67 ± 0,46 ^f | 8,67 ± 2,00 ^e | 13,32 ± 2,29 ^d | 16,51 ± 2,21 ^c | 21,13 ± 4,04 ^b | 27,04 ± 4,93 ^a |

Fonte: COSTA (2018).

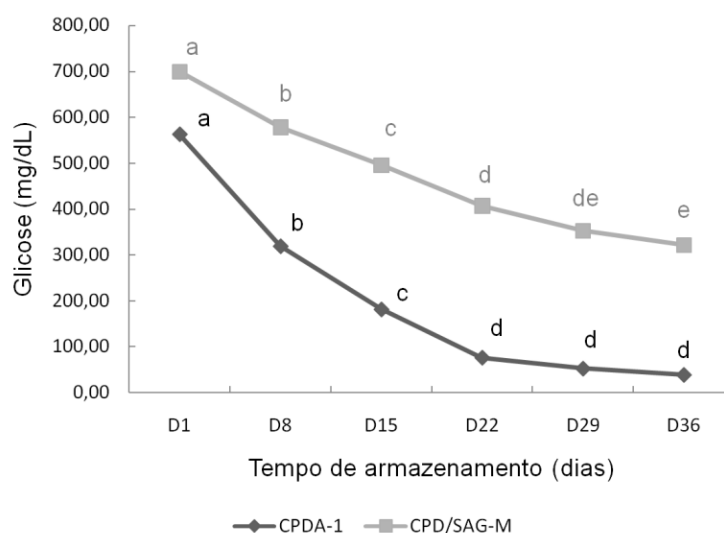
Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.3.1 Glicose

Os valores das médias do nível de glicose das bolsas CPDA-1 apresentaram uma diminuição gradativa, com diferença estatística ($P < 0,05$) a partir do momento D1 ao D22, e em seguida houve estabilização dos valores das médias até o final do experimento (momento D36 de armazenamento).

O nível de glicose das bolsas CPD/SAG-M apresentou uma diminuição gradativa, com diferença estatística ($P < 0,05$) a partir do D1 ao D22, porém, sem apresentar diferença estatística nas médias entre D29 e D36 de armazenamento (Figura 21).

Figura 21: Representação gráfica da variação da concentração de glicose por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



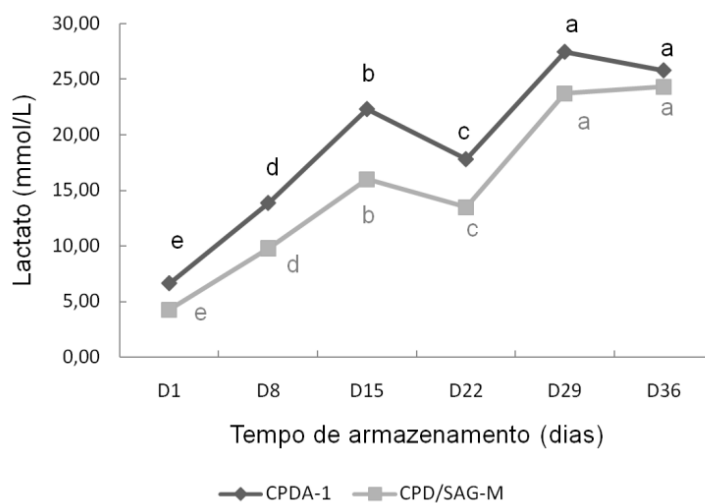
Fonte: COSTA (2018).

Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.3.2 Lactato

As concentrações de lactato apresentaram variações nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M, os quais foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$), apresentando um aumento significativo a partir do momento D1 ao D15, uma diminuição significativa do momento D15 ao D22 e novamente um aumento significativo entre D22 e D29, não havendo variação estatisticamente significativa nos valores das médias do momento D29 ao D36 de armazenamento (Figura 22).

Figura 22: Representação gráfica da variação da concentração de lactato por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



Fonte: COSTA (2018).

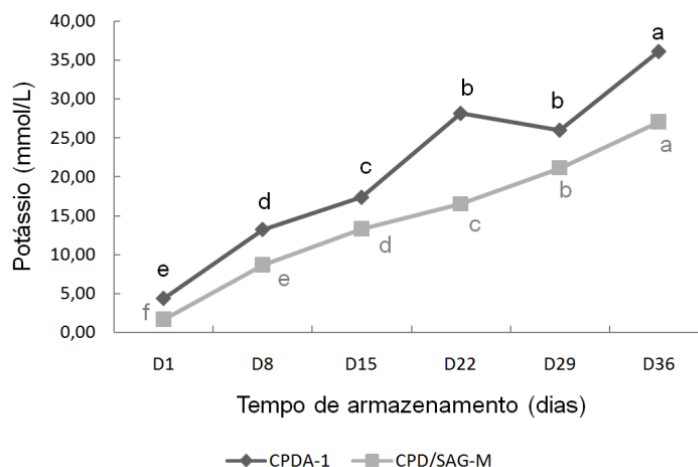
Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.3.3 Potássio (K^+)

Os níveis de potássio das bolsas CPDA-1 apresentaram um aumento com diferença estatística ($P < 0,05$) a partir do momento D1 ao D22 e D29 ao D36 de armazenamento.

Os níveis de potássio das bolsas CPD/SAG-M apresentaram um aumento com diferença estatística ($P < 0,05$) em todos os momentos analisados (Figura 23).

Figura 23: Representação gráfica da variação da concentração de potássio por tempo de armazenamento (dias) nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.



Fonte: COSTA (2018).

Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

6.4 MUDANÇAS PROPORCIONAIS EM VALORES PERCENTUAIS

As mudanças proporcionais, em valores percentuais, para os parâmetros VCM, CHCM, VG, pH, PO_2 , PCO_2 , SpO_2 , HCO_3^- , glicose e lactato, entre os dias da primeira e última análise, de cada parâmetro, foram apresentados na Tabela 4. Os valores positivos indicaram o aumento do parâmetro analisado e os valores negativos indicaram a redução do mesmo.

A análise estatística de variância percentual da hemoglobina plasmática e grau de hemólise não foi possível realizar a partir da primeira análise, por haver valores iguais a zero. No entanto, ao avaliar estes parâmetros a partir da segunda análise (D8), a variação percentual da hemoglobina plasmática foi de $669,24 \pm 927,78$ e $171,51 \pm 178,48$ nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M, respectivamente, apresentando $P=0,1341$, e a variação percentual do grau de hemólise de $518,04 \pm 763,94$ e $150,61 \pm 116,35$ nas bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M, respectivamente, apresentando $P=0,1732$. Porém, observa-se uma grande dispersão destes dados com um coeficiente de variação maior que 100%.

A análise estatística do número de hemácias e níveis plasmáticos de potássio não foi realizada devido à variação que houve de alguns resultados entre os valores semanais.

Tabela 4. Modificações percentuais (média \pm desvio padrão) ao longo do tempo de armazenamento, dos parâmetros volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume globular (VG), potencial hidrogeniônico (pH), pressão parcial de oxigênio (PO_2), pressão de dióxido de carbono (PCO_2), saturação de oxigênio (SpO_2), bicarbonato (HCO_3^-), glicose e lactato, nas amostras das bolsas de sangue contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M.

| Parâmetro | Tipo de bolsa | | P-Valor |
|-----------|------------------------|------------------------|---------|
| | BOLSA CPDA-1 | BOLSA CPD/SAG-M | |
| VCM | 10,50 \pm 3,61 (%) | 6,38 \pm 2,35 (%) | 0,0129 |
| CHCM | -8,08 \pm 3,76 (%) | -7,04 \pm 2,48 (%) | 0,5059 |
| VG | 13,95 \pm 7,90 (%) | 9,99 \pm 4,33 (%) | 0,2127 |
| pH | -2,03 \pm 0,47 (%) | -4,32 \pm 0,60 (%) | <0,0001 |
| PO_2 | 285,03 \pm 36,91 (%) | 278,39 \pm 23,51 (%) | 0,6604 |
| PCO_2 | -36,65 \pm 10,39 (%) | -8,37 \pm 9,29 (%) | <0,0001 |
| SpO_2 | 49,94 \pm 11,26 (%) | 44,99 \pm 10,84 (%) | 0,3714 |
| HCO_3^- | -51,83 \pm 8,88 (%) | -52,30 \pm 9,95 (%) | 0,9201 |
| GLICOSE | -94,11 \pm 5,90 (%) | -54,17 \pm 7,70 (%) | <0,0001 |
| LACTATO | 302,23 \pm 94,11 (%) | 472,17 \pm 70,64 (%) | 0,0007 |

Fonte: COSTA (2018).

Ao avaliar a dinâmica percentual, observou-se diferença estatística entre as amostras das bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M nos parâmetros VCM, pH, PCO_2 , glicose e lactato.

6.5 CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS

Nas análises das bolsas contendo a solução CPDA-1, os parâmetros que apresentaram uma forte correlação foram: hemoglobina livre *versus* grau de hemólise, pH *versus* HCO_3^- , PO_2 *versus* PCO_2 , PO_2 *versus* SpO_2 , PO_2 *versus* HCO_3^- , PO_2 *versus* K^+ , PCO_2 *versus* HCO_3^- , PCO_2 *versus* K^+ , SpO_2 *versus* HCO_3^- , SpO_2 *versus* lactato, SpO_2 *versus* K^+ , HCO_3^- *versus* lactato, HCO_3^- *versus* K^+ , glicose *versus* lactato e glicose *versus* K^+

Os parâmetros que apresentaram uma moderada correlação foram: hemoglobina livre *versus* lactato, hemoglobina livre *versus* K^+ , grau de hemólise *versus* K^+ , pH *versus* PO_2 , pH *versus* PCO_2 , pH *versus* SpO_2 , pH *versus* lactato, pH *versus* K^+ , PO_2 *versus* lactato, PCO_2 *versus* SpO_2 , PCO_2 *versus* lactato, SpO_2 *versus* glicose, HCO_3^- *versus* glicose, HCO_3^- *versus* lactato e HCO_3^- *versus* K^+ (Tabela 5).

Tabela 5. Coeficiente de correlação de Pearson entre os parâmetros hemoglobina livre (Hg livre), grau de hemólise (Hemólise), potencial hidrogeniônico (pH), pressão parcial de oxigênio (PO_2), pressão de dióxido de carbono (PCO_2), saturação de oxigênio (SpO_2), bicarbonato (HCO_3^-), glicose, lactato e potássio (K^+), obtidas das análises das bolsas contendo a solução CPDA-1.

| | Hg livre | Hemólise | pH | PO_2 | PCO_2 | SpO_2 | HCO_3^- | Glicose | Lactato | K^+ |
|-----------|----------|----------|--------|---------|----------|---------|-----------|---------|----------|----------|
| Hg livre | 1 | 0.896** | -0.451 | 0.503 | -0.432 | 0.542 | -0.557 | -0.579 | 0.671* | 0.611* |
| Hemólise | | 1 | -0.377 | 0.415 | -0.324 | 0.451 | -0.470 | -0.406 | 0.541 | 0.600* |
| pH | | | 1 | -0.694* | 0.618* | -0.689* | 0.900** | 0.508 | -0.656* | -0.650* |
| PO_2 | | | | 1 | -0.851** | 0.881** | -0.853** | -0.571 | 0.685* | 0.905** |
| PCO_2 | | | | | 1 | -0.732* | 0.807** | 0.526 | -0.651* | -0.821** |
| SpO_2 | | | | | | 1 | -0.872** | -0.749* | 0.809** | 0.885** |
| HCO_3^- | | | | | | | 1 | 0.655* | -0.802** | -0.862** |
| Glicose | | | | | | | | 1 | -0.847** | -0.859** |
| Lactato | | | | | | | | | 1 | 0.828** |
| K^+ | | | | | | | | | | 1 |

Fonte: COSTA (2018).

**Correlação forte: $0,8 \leq r \leq 1$ positiva e $-1 \leq r \leq -0,8$ negativa.

*Correlação moderada: $0,6 \leq r \leq 0,8$ positiva e $-0,8 \leq r \leq -0,6$ negativa.

Correlação fraca: $0,1 \leq r < 0,6$ positiva e $-0,6 \leq r < -0,1$ negativa.

Nas análises das bolsas contendo a solução CPD/SAG-M, os parâmetros que apresentaram uma forte correlação foram: hemoglobina livre *versus* grau de hemólise, pH *versus* HCO_3^- , PO_2 *versus* SpO_2 , PO_2 *versus* lactato, PO_2 *versus* K^+ , SpO_2 *versus* HCO_3^- , glicose *versus* lactato, glicose *versus* K^+ e lactato *versus* K^+

Os parâmetros que apresentaram moderada correlação foram: hemoglobina livre *versus* PO_2 , hemoglobina livre *versus* SpO_2 , hemoglobina livre *versus* glicose, hemoglobina livre *versus* lactato, hemoglobina livre *versus* K^+ , grau de hemólise *versus* PO_2 , hemólise *versus* SpO_2 , hemólise *versus* glicose, hemólise *versus* lactato, hemólise *versus* K^+ , pH *versus* SpO_2 , PO_2 *versus* glicose, SpO_2 *versus* glicose, SpO_2 *versus* lactato, SpO_2 *versus* K^+ (Tabela 6).

Tabela 6. Coeficiente de correlação de Pearson entre os parâmetros hemoglobina livre (Hg livre), grau de hemólise (Hemólise), potencial hidrogeniônico (pH), pressão parcial de oxigênio (PO_2), pressão de dióxido de carbono (PCO_2), saturação de oxigênio (SpO_2), bicarbonato (HCO_3^-), glicose, lactato e potássio (K^+), obtidas das análises das bolsas contendo a solução CPD/SAG-M.

| | Hg livre | Hemólise | pH | PO_2 | PCO_2 | SpO_2 | HCO_3^- | Glicose | Lactato | K^+ |
|-----------|----------|----------|-------|--------|---------|---------|-----------|---------|----------|----------|
| Hg livre | 1 | 0.958** | 0.110 | 0.617* | 0.038 | 0.683* | -0.018 | -0.747* | 0.672* | 0.746* |
| Hemólise | | 1 | 0.212 | 0.617* | -0.069 | 0.688* | 0.085 | -0.730* | 0.654* | 0.683* |
| pH | | | 1 | -0.209 | -0.255 | -0.746* | 0.983** | -0.106 | -0.151 | -0.136 |
| PO_2 | | | | 1 | -0.090 | 0.872** | -0.363 | -0.784* | 0.806** | 0.820** |
| PCO_2 | | | | | 1 | -0.030 | -0.237 | -0.094 | 0.156 | 0.131 |
| SpO_2 | | | | | | 1 | -0.821** | -0.791* | 0.749* | 0.737* |
| HCO_3^- | | | | | | | 1 | 0.057 | -0.309 | -0.296 |
| Glicose | | | | | | | | 1 | -0.847** | -0.826** |
| Lactato | | | | | | | | | 1 | 0.878** |
| K^+ | | | | | | | | | | 1 |

Fonte: COSTA (2018).

**Correlação forte: $0,8 \leq r \leq 1$ positiva e $-1 \leq r \leq -0,8$ negativa.

*Correlação moderada: $0,6 \leq r \leq 0,8$ positiva e $-0,8 \leq r \leq -0,6$ negativa.

Correlação fraca: $0,1 \leq r < 0,6$ positiva e $-0,6 \leq r < -0,1$ negativa.

7. DISCUSSÃO

Os parâmetros avaliados neste estudo apresentaram diferenças na maioria das análises quantitativas e qualitativas, entre as amostras das bolsas plásticas contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M, em decorrência das soluções conservantes apresentarem distinção em relação à sua composição e volume (BRASIL, 2014).

Observou-se que os parâmetros quantitativos, tais como o número de hemácias, volume globular, hemoglobina livre, bicarbonato, lactato e potássio, apresentaram valores evidentemente inferiores nas bolsas CPD/SAG-M, devido à diluição do concentrado de hemácias em seu maior volume de solução conservadora (solução Sag-manitol).

Nos parâmetros qualitativos foram observados, pelos testes estatísticos, diferenças quanto ao metabolismo eritrocitário nos tempos analisados, na variação percentual e correlação dos resultados de algumas análises nas amostras das bolsas plásticas contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M.

Os estudos existentes em equinos sobre a avaliação da conservação de bolsas de sangue não realizaram simultaneamente as análises sobre o armazenamento de concentrado de hemácias em bolsas contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M (MUDGE et al., 2004; NIINISTÖ et al., 2008). Sendo assim, este estudo possibilitou demonstrar, de forma mais precisa, a dinâmica do metabolismo eritrocitário do concentrado de hemácias armazenado nas duas soluções.

7.1 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

Neste estudo, apenas as amostras das bolsas contendo a solução CPD/SAG-M demonstraram uma redução significativa ($P < 0,05$) do número de hemácias apenas no momento (D22) da análise. Essa redução provavelmente está relacionada a uma falha técnica na diluição, pipetagem e/ou leitura do equipamento, ocasionando uma falsa diminuição no número de hemácias, pois as análises dos momentos seguintes (D29 e D36) apresentaram valores médios superiores e sem diferença estatística quando comparado aos momentos iniciais (D8 e D15). Sendo assim, pode-se considerar que o concentrado de hemácias de equinos, armazenado tanto nas bolsas contendo a solução CPDA-1 quanto as que contém CPD/SAG-M, não apresentaram redução do número de eritrócitos ao ponto de causar alterações estatisticamente significativas.

Na análise da hemoglobina livre, as amostras das bolsas contendo a solução CPDA-1 apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) deste parâmetro mais tardiamente do que as amostras obtidas da solução CPD/SAG-M. Na análise do grau de hemólise, observou-se um aumento significativo, durante o período de armazenamento, apenas nas amostras das bolsas contendo a solução CPD/SAG-M. Assim como a hemoglobina livre, o grau de hemólise está relacionado à ruptura das hemácias, durante o armazenamento, associada ao aumento da fragilidade osmótica, em consequência das alterações na membrana eritrocitária (HESS, 2006; ZUBAIR, 2010; ORLOV; KARKOUTI, 2015). No entanto, assim como foi observado na avaliação da conservação de sangue total de equinos por Mudge et al., 2004, apesar de não haver diminuição significativa no número de hemácias, houve presença de hemólise nos concentrados de hemácias. Porém, a média obtida neste estudo com maior grau de hemólise, sendo o momento D36 nas amostras das bolsas CPD/SAG-M (0,46%), foi bastante inferior ao determinado por Wardrop et al. (1994) em humanos ($< 1\%$). No presente estudo, o grau de hemólise das amostras, contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M, apresentou valores médios semelhantes aos encontrados nos estudos em equinos realizados por Mudge et al. (2004) e Niinistö et al. (2008), respectivamente.

As alterações quanto o aumento do VG e VCM e diminuição do CHCM, estão associadas à variação osmótica intraeritrocitária em consequência da falha da bomba de Na^+/K^+ , levando ao acúmulo de componentes osmoticamente ativos e a perda progressiva de área superficial dos eritrócitos, promovendo assim o aumento do VG e, conseqüentemente, do VCM e diminuição do CHCM (WOLFE, 1985; KRIEBARDIS et al., 2007). No entanto, após a transfusão, pode haver a reversibilidade dessa alteração, a depender do tempo de armazenamento, conforme ocorra à reposição de ATP e 2,3 DPG nos eritrócitos transfundidos (SCOTT et al., 2005; D'ALESSANDRO et al., 2010).

Os resultados das análises hematológicas deste estudo demonstram que as bolsas contendo a solução CPDA-1 apresentaram mais alteração de lesão de armazenamento apenas referente ao aumento VCM, enquanto que as amostras obtidas das bolsas contendo a solução CPD/SAG-M apresentaram lesões de armazenamento mais precoce nos parâmetros hemoglobina livre, VG, CHCM e de maior intensidade no grau de hemólise, ou seja, maior fragilidade osmótica. Teoricamente, o manitol, presente nas bolsas contendo a solução CPD/SAG-M, proporciona mais viabilidade do concentrado de hemácias por fornecer mais estabilização da membrana eritrocitária e, conseqüentemente, diminuindo os níveis de hemólise ao decorrer do armazenamento (HÖGMAN, 1998; HESS, 2006). Porém, neste

estudo, apesar do manitol, presente na solução CPD/SAG-M, ter fornecido mais suporte osmótico, ao retardar a lesão de armazenamento relacionada ao aumento do VCM, não promoveu mais resistência na membrana eritrocitária dos equinos e, conseqüente, ocasionou mais precocemente o aumento significativo da hemoglobina livre e do grau de hemólise.

7.2 ANÁLISES HEMOGASOMÉTRICAS

Os resultados dos valores do potencial hidrogeniônico (pH) apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,05$), nas bolsas contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M, a partir do mesmo momento (D1) de armazenamento, porém, ao avaliar a dinâmica percentual, a diminuição do pH foi, em média, duas vezes superior nas amostras contendo a solução CPD/SAG-M. Com base nesta análise, ocorreu mais lesão de armazenamento nas amostras das bolsas contendo a solução CPD/SAG-M, por diminuição deste parâmetro. Entretanto, o valor médio do pH obtido do concentrado de hemácias no momento D36, da mencionada bolsa, ainda permite a síntese de ATP, importante para o metabolismo energético dos eritrócitos. Segundo Hess e Greewalt (2002), o valor do pH igual a 6,65 em eritrócitos humanos armazenados promoveu a síntese e o consumo balanceado de ATP. Além disso, os mesmos autores consideraram que o limite inferior do pH para o armazenamento de hemácias, em vários sistemas, deve ser em torno de 6,2.

A diminuição do pH, relatado também em equinos por Mudge et al. (2004), em cães por Costa Júnior et al. (2008), em humanos por Högman (2008) e em ovinos por Sousa et al. (2013), é uma das principais alterações metabólicas que ocorre ao longo do período de armazenamento (HESS, 2010), decorrentes dos ácidos metabólicos (ácido láctico e pirúvico) provenientes do metabolismo anaeróbico dos eritrócitos durante o armazenamento (D'ALESSANDRO et al., 2010; YOSHIDA; SHEVKOPLYAS, 2010; KISIELEWICZ; SELF, 2014).

A diminuição gradativa do HCO_3^- , observada neste estudo nas amostras das bolsas contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M, a partir do mesmo momento (D1) de armazenamento, também foi relatada em cães por Costa Júnior et al. (2008), em asininos por Tavares et al. (2011) e ovinos por Sousa et al. (2013), nos quais a redução nos valores sanguíneos do HCO_3^- pode ser associada ao consumo deste íon no controle da acidez, reduzindo os seus níveis na mesma proporção em que há a produção de ácidos metabólicos no interior das bolsas (ORLOV; KARKOUTI, 2015). No entanto, apesar do teste de Pearson ter comprovado essa relação, demonstrando uma forte correlação positiva do pH com o

bicarbonato nas bolsas CPDA-1 (0,900) e CPD/SAG-M (0,983), não houve diferença estatística ao avaliar a dinâmica percentual das análises quanto à diminuição do HCO_3^- , entre as soluções conservadoras do presente estudo. O tamponamento de bicarbonato para a manutenção do pH ácido é eficaz por impulsionar a difusão do dióxido de carbono para o meio externo das bolsas plásticas (SCOOT et al., 2005).

A pressão parcial de oxigênio (PO_2) e a saturação de oxigênio (SpO_2) apresentaram um aumento gradativo e significativo nas amostras das bolsas contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M. A PO_2 e a SpO_2 apresentaram uma correlação fortemente positiva nas amostras das soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M (0,881 e 0,872, respectivamente), nas quais o aumento da PO_2 se reflete no aumento da SpO_2 . Os resultados quanto ao aumento do PO_2 também foram relatados nos estudos em asininos, por Tavares et al. (2011) e em cães por Costa Júnior et al. (2008). No presente estudo, as amostras de sangue obtidas nas soluções CPDA-1 apresentaram variações mais tardiamente destes parâmetros, quando comparado aos resultados obtidos das análises das amostras das soluções CPD/SAG-M, no entanto, não houve diferença, entre as soluções, quanto à dinâmica percentual referente à intensidade da lesão de armazenamento da PO_2 e SpO_2 .

O aumento significativo da PO_2 e SpO_2 durante o armazenamento, nas amostras de ambas as soluções conservadoras, pode ser justificado pela composição do plástico das bolsas de armazenamento ser permeável ao oxigênio (BRASIL, 2014) e pela afinidade do oxigênio à hemoglobina estar relacionada à dissociação da mesma. A afinidade da hemoglobina para o oxigênio é influenciada pelo pH e o CO_2 , pois tanto o H^+ quanto o CO_2 promovem a liberação do O_2 ligado (SCOTT & STOCKHAM, 2011). A relação da SpO_2 com o pH e PCO_2 é comprovada pelo teste de Pearson, no qual demonstrou uma moderada correlação negativa da SpO_2 com o pH, nas amostras contendo a solução CPDA-1 (-0,689) e CPD/SAG-M (-0,746), e uma moderada correlação negativa da SpO_2 com a PCO_2 nas amostras contendo a solução CPDA-1 (-0,732) e fraca correlação negativa da SpO_2 com a PCO_2 nas amostras contendo a solução CPD/SAG-M (-0,030). A fraca correção negativa da SpO_2 com a PCO_2 , apenas nas amostras contendo a solução CPD/SAG-M, foi em consequência da oscilação nos valores médios de PCO_2 nas amostras contendo a solução CPD/SAG-M, que serão apresentados a seguir.

A pressão parcial de gás carbônico (PCO_2) apresentou uma diminuição significativa nas análises, sendo mais precoce nas amostras obtidas das soluções CPDA-1. Ao avaliar a dinâmica percentual das amostras, a diminuição do PCO_2 foi superior nas amostras contendo CPDA-1. Apenas as amostras contendo a solução CPD/SAG-M, apresentaram um aumento

significativo da PCO_2 , no momento D29, mas houve, na análise seguinte, uma diminuição significativa no momento D36 de armazenamento.

Estudos demonstram que a PCO_2 nas amostras de bolsas de sangue não segue um padrão linear. Estudo realizado por Tavares et al. (2011), com amostras de bolsa de sangue total de asininos, apresentou aumento da PCO_2 e atribuiu esse resultado ao controle ácido-básico, em que a reação de neutralização do ácido láctico pelo bicarbonato (HCO_3^-) resulta na produção de água e CO_2 . No entanto, Hess (2006) destacou que após a formação do CO_2 , durante o armazenamento, este se difunde para fora da bolsa plástica, removendo prótons da solução e diminuindo a PCO_2 e, conseqüentemente, a taxa de redução do pH. Sendo assim, no presente estudo, a diminuição da PCO_2 , em ambas as soluções conservadoras, e sua oscilação nos valores médios obtidos, entre o D22 e D36, das amostras contendo CPD/SAG-M, podem ser justificadas por um possível efeito Bohr e pela permeabilidade da bolsa de plástico à passagem de gases para o meio externo, contribuindo para a diminuição deste parâmetro (Sousa et al., 2013).

Em consequência da oscilação nos valores médios de PCO_2 nas bolsa CPD/SAG-M, o teste estatístico de Person demonstrou uma correlação diferente entre o pH com PCO_2 nas bolsas contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M, no qual o pH das amostras das soluções CPDA-1 demonstraram uma correlação moderada positiva com PCO_2 (0,618), e nas amostras das soluções CPD/SAG-M o pH e PCO_2 demonstraram uma correlação fraca negativa (0,255). Essa diferença pode justificar o consumo do bicarbonato ter sido similar entre as soluções, embora o pH tenha sido significativamente inferior nas bolsas CPD/SAG-M.

7.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os valores médios da glicose apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,05$) nas amostras contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M no presente estudo. Ao avaliar a dinâmica percentual deste parâmetro, a diminuição da glicose foi superior nas amostras contendo a solução CPDA-1, representando assim, um maior consumo de glicose nesta solução. Esse resultado demonstrou que a dextrose anidra, presente na solução CPDA-1, foi mais eficiente para o fornecimento de fonte de energia (ATP), quando comparada à glicose monohidratada, presente na solução CPD/SAG-M. Sendo assim, existem diferenças no metabolismo dos eritrócitos dos equinos referente ao consumo energético de dextrose anidra e glicose monohidratada, porém não há estudos específicos sobre o metabolismo energético dos

eritrócitos dos equinos que justifique essa diferença. Do ponto de vista clínico, vale ressaltar que a transfusão de concentrado de hemácias com níveis elevados de glicose pode levar a um aumento de insulina no indivíduo transfundido, fato que deve ser levado em consideração quando se transfunde grandes volumes, caso o receptor sofra de disfunção metabólica (LACERDA et al., 2014).

Estudos realizados em concentrado de hemácias de suínos armazenado em bolsas contendo CPD/SAG-M, por PATEL et al. (2013), demonstraram que, diferentemente do que foi observado em bolsas contendo sangue humano, os eritrócitos de suínos não utilizaram a glicose, como esperado, como fonte energética, esgotando mais rapidamente os níveis de ATP. Nos estudos realizados em equinos por Mudge et al. (2004), observou-se que o consumo de glicose nas bolsas de sangue é substancialmente menor em equinos quando comparado aos cães e humanos, e esse resultado sugere que os eritrócitos de equinos armazenados podem ser menos ativos metabolicamente. Sendo assim, levanta-se a hipótese de que o metabolismo energético dos eritrócitos dos equinos seja mais semelhante aos dos suínos do que ao de humanos e cães.

A diminuição dos níveis de glicose apresentou o mesmo valor de correlação fortemente negativa (-0,847) com o aumento significativo nos níveis de lactato nas amostras contendo as soluções CPDA-1 e CPD/SAG-M, uma vez que a diminuição dos níveis de glicose foi inversamente proporcional ao aumento dos níveis de lactato. O aumento dos valores médios de lactato, nas amostras de ambas as soluções conservadoras, foi significativo a partir do mesmo momento (D1) de armazenamento. No entanto, ao avaliar a dinâmica percentual, as amostras contendo a solução CPD/SAG-M apresentaram mais lesão de armazenamento referente ao aumento deste parâmetro.

O aumento do lactato, durante o armazenamento, indica um metabolismo mais ativo dos eritrócitos, resultando em uma glicólise contínua e, conseqüentemente, na acumulação de seu subproduto primário, o ácido láctico, no sobrenadante. A acidose resultante inibe a glicólise através de um loop de feedback negativo, o que resulta em uma redução progressiva nos níveis de ATP, 2,3-DPG e NADH (FLATT et al., 2014), o que pode justificar a variação não significativa da glicose nos momentos D22, D29 e D36 de armazenamento das bolsas CPDA-1 e nos momentos D29 e D36 de armazenamento das bolsas CPD/SAG-M.

Os níveis de potássio em ambas as bolsas apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) a partir do mesmo momento (D1) de armazenamento. Durante o armazenamento, a bomba de Na^+/K^+ , presente na membrana celular, falha progressivamente devido à temperatura baixa de armazenamento, à diminuição dos níveis de ATP e à lesão progressiva

da membrana que ocorre durante a estocagem, levando ao extravasamento do potássio intracelular para o meio extracelular (HÖGMAN, 1998). O teste de Person comprovou uma forte correlação negativa entre o potássio e glicose, nas bolsas CPDA-1 (-0.859) e CPD/SAG-M (-0.826), nas quais a diminuição dos níveis de glicose apresentou relação inversamente proporcional ao aumento dos níveis de potássio extracelular.

O resultados dos níveis médios de potássio obtidos no momento D36 das amostras das bolsas contendo a solução CPD/SAG-M, do presente estudo (27,04 mmol/L), foram semelhantes ao obtido do concentrado de hemácias de equinos por Niinistö et al. (2008), armazenado por 35 dias, que foi igual a 28,5 mmol/L em solução CPDA/SAG-M. No entanto, foram bastante diferentes dos resultados em sangue total em cães obtidos por Costa Júnior et al. (2008) e em gatos por Bertolleti (2011), nos quais os níveis de potássio médio foram de 5,1 e 4,8 mmol/L, respectivamente. No estudo realizado por Sousa et al. (2013), em sangue total de ovinos armazenados em solução CPDA-1, os resultados encontrados de potássio chegaram a 22,85 mmol/L. A variação dos níveis de potássio entre esses estudos ocorrem devido as hemácias conterem níveis intracelulares variáveis de potássio entre as espécies (OBRADOR et al., 2015). Segundo Muylle et al. (1984) e Speak (1997) na espécie equina as concentrações de potássio intracelular são altas, sendo assim, considera-se que o extravasamento deste íon, no decorrer do armazenamento da bolsa de sangue, pode resultar em um hemocomponente impróprio para a transfusão, pois, se transfundido rapidamente e em grandes volumes, pode resultar em arritmias cardíacas ao receptor (COSTA JUNIOR et al., 2008; HESS, 2010; BROWN e VAP, 2015).

Os resultados das análises hemogasométricas e bioquímicas deste estudo demonstraram que as variações nos resultados entre os períodos de armazenamento das bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M são devidos ao metabolismo anaeróbico dos eritrócitos se comportarem de forma distinta entre as soluções conservadoras (BERTOLETTI, 2011), principalmente a diferença entre os principais componentes responsáveis pela fonte de energia em cada bolsa de armazenamento: a dextrose anidra (CPDA-1), a glicose monohidratada (CPD/SAG-M), e a quantidade de adenina presente em cada uma.

Ao analisar o momento inicial das lesões de armazenamento e a intensidade de algumas das principais alterações metabólicas, que ocorreram ao longo do período de armazenamento, sendo estas o grau de hemólise o pH e os níveis de lactato e glicose (HÖGMAN, 1998; HESS, 2010), os resultados deste estudo sugerem que as bolsas contendo a solução CPDA-1 são mais

eficientes do que as bolsas contendo a solução CPD/SAG-M para a manutenção da viabilidade dos eritrócitos de equinos.

8. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que tanto os concentrados de hemácias armazenados em bolsas CPDA-1 como em CPDA/SAG-M apresentaram viabilidade para uso, quando conservadas, sob refrigeração, por 35 dias.

No entanto, as diferenças observadas quanto ao aspecto das lesões de armazenamento, demonstraram que a solução preservativa CPDA-1 ofereceu um melhor meio para o armazenamento de concentrado de hemácias de equino, por um período de 35 dias.

Para uma melhor compreensão sobre as lesões de armazenamento em bolsas de sangue de equinos, são necessários estudos que avaliem o metabolismo energético de eritrócitos desta espécie.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUTHEMENT, J.M.; WOLFSHEIMER, K.J.; CATCHING, S. Canine blood component therapy: product preparation, storage and administration. **Jornal of American Animal Hospital Association**, v.23, p.483-493, 1986.

BAUER, A.W. From Blood Transfusion to Haemotherapy – The Anniversary of the German Society for Transfusion Medicine and Immunology (DGTI) from a Medicinal-Historical and Bioethical Perspective^a. **Tranfusion Medicine and Hemotherapy**, v.31, p.2-6, 2004.

BERTOLETTI, B. **Peroxidação lipídica e parâmetros bioquímicos do sangue total felino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria. 2011.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**, Brasília, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. **Módulo 3 : Principais Síndromes Infeciosas/Agência Nacional de Vigilância Sanitária**.– Brasília: Anvisa, 2013. Available from: <<http://www.saude.mt.gov.br/upload/controle-infeccoes/pasta13/modulo3.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da saúde. **Resolução da diretoria colegiada - RDC N° 35**, de 12 de junho de 2014. Available from: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0035_12_06_2014.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2018.

BROWN, D.; VAP, L. Princípios sobre transfusão sanguínea e reação cruzada. In: THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, ed. 1, São Paulo: ROCA, cap. 15, p.188-198, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline. **CLSI document M47-A**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2007. Available from: <<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m47/>>.

COSTA JÚNIOR, J.; VIANA, J.A.; RIBEIRO FILHO, J.D.; FAVARATO, E.S.; MATA, L.C.; ARGÔLO NETO, N. Parâmetros bioquímicos e hemogasométricos do sangue total canino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M. **Ciência Rural**, v.38, n. 2, p.378-383, 2008.

D'ALESSANDRO, A.; LIUMBRUNO, G.; GRAZZINI, G.; ZOLLA, L. Red blood cell storage: the story so far. **Blood Transfusion**, v.8, n.2, p.82-88, 2010.

DAVIDOW, B. Transfusion Medicine in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.43, n.4, p.735-756, 2013.

DURHAM, A.E. Blood and plasma transfusion in the horse. **Equine Veterinary Education**, v.8, n.1, p.8-12, 1996.

EDWARDS, M.J.; MARTIN R.J. Mixing technique for the oxygen-hemoglobin equilibrium and Bohr effect. **American Physiological Society**, v.21, n.6, p.1898-1902, 1966.

FLATT J.F.; BAWAZIR W.M.; BRUCE L.J. The involvement of cation leaks in the storage lesion of red blood cells. **Frontiers in Physiology**, v.5, n.214, p.1-12, 2014.

FLEGEL, W.A.; NATANSON, C.; KLEIN, H.G. Does prolonged storage of red blood cells cause harm?. **British Journal of Haematology**, v.165, n.1, p.3-16, 2014.

GIANGRANDE, P.L.F. The history of blood transfusion. **British Journal of Haematology**, v.110, n.4, p.758-767, 2000.

GRAY, G.B.D. **Historical sketch of the operation of blood trasnfusion**. Tese (doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina do Porto. 1922.

GREENWAL, T.J. A short history of transfusion medicine. **Transfusion**, v.37, n.5, p.550-563, 1997.

HANN, L.; BROWN, D.C.; KING, L.G. CALLAN, M.B. Effect of duration of packed red blood cell storage on morbidity and mortality in dogs after transfusion: 3,095 cases (2001–2010). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.28, n.6, p.1830-1837, 2014.

HÉBERT, P.C.; CHIN-YEE, I.; FERGUSSON, D.; BLAJCHMAN, M.; MARTINEAU, R.; CLINCH, J.; OLBERG, B. A pilot trial evaluating the clinical effects of prolonged storage of red cells. **International Anesthesia Research Society**, v.100, N.5, p.1433-1438, 2005.

HESS, J.R. An update on solutions for red cell storage. **Vox sanguinis**, v.91, n.1, p.13-19, 2006.

HESS, J.R. Red cell changes during storage. **Transfusion and Apheresis Science**, v.43, p.51-59, 2010.

HESS, J.R.; GREENWALT, T.G. Storage of red blood cells: New approaches. **Transfusion Medicine Reviews**, v.16, p.283-295, 2002.

HÖGMAN, C.F. Preparation and preservation of red cells. **Vox Sanguinis**, v. 74, n.2, p.177-187, 1998.

HÖGMAN, C.F; VERDIER, C.H; ERICSON, A; HEDLUND, K; SANDHAGEN, B. Studies of the mechanism of human rd cell loss of viability during storage at 4+ degrees C *in vitro*. **Vox Sanguinis**, v.53, n. 2, p.84-88, 1985.

HURCOMBE, S.D.; MUDGE, M.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clinical and clinicopathologic variables in adult horses receiving blood transfusions: 31 cases (1999–2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.231, n.2, p.267-274, 2007.

KLEIN, B.G. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p.608.

KOCH, C.G.; LI, L.; SESSLER, D.I.; FIGUEROA, P.; HOELTGE, G.A.H.; MIHALJEVIC, T. BLACKSTONE, E.H. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. **The New England Journal of Medicine**, v.358, p.1229-1239, 2008.

KRIEBARDIS, A.G.; ANTONELLOU, M.H.; STAMOULIS, K.E.; ECONOMOU-PETERSEN, E.; MARGARITIS, L.H; PAPASSIDERI, I.S. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**,v.11, n.1, p.148–155, 2007.

KUMAR, R. Blood Transfusion in Veterinary Medicine. **Hematology & Transfusion International Journal**,v.4, n.4, p.1-8, 2017.

LACERDA, L.A.; HLAVAC, N.R.C.; TERRA, S.R.; BACK, F.P. WARDROP, K.J.; GONZÁLEZ, F.H.D. Effects of four additive solutions on canine leukoreduced red cell concentrate quality during storage. **Veterinary Clinical Pathology**, v.43, n.3, p.362-370, 2014.

LANEVSKI A.; WARDROP K.J. Principles of transfusion medicine in small animals. **The Canadian Veterinary Journal**,v.42, n.6, p.447-454, 2001.

LASSEN, E.D.; SWARDSON, C.J. Hematology and hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.11, n.3, p.351-389, 1995.

MACHADO, L.P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M.E.; SILVEIRA, V.F.; YONEZAWA, L.A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**,v.8, n.1, p.84-94, 2009.

MERYMAN, H.T; HORNBLOWER, M; SYRING, R.L. Prolonged storage of red cells at 4°C. **Transfusion**, v.26, p.500-505, 1986.

SOARES, B.M.D.; ALMEIDA, D. SILVA, M.L.B.; RIBINIK, M.L.R. Coleta de sangue dos doadores. **Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids**, Brasília, 1998.

MUDGE, M.C. Acute hemorrhage and blood transfusions in horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.30, n.2, p 427-436, 2014.

MUDGE, M.C.; MACDONALD, M.H.; OWENS, S.D.; TABLIN, F. Comparison of 4 blood storage methods in a protocol for equine pre-operative autologous donation. **Veterinary Surgery**,v.33, n.5, p.475–486, 2004.

NIINISTÖ, K.; RAEKALLIO, M; SANKARI, S. Storage of equine red blood cells as a concentrate. **The Veterinary Journal**,v.176, n.2, p. 227-231, 2008.

OHTO, H.; NOLLET, K.E. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. **Transfusion and Apheresis Science**,v.44, n.3, p.321-325, 2011.

ORLOV, D; KARKOUTI, K. The pathophysiology and consequences of red blood cell storage. **Anaesthesia**,v.70, n. 1, p.29-37, 2015.

PATEL, N.N.; LIN, H.; JONES, C.; WALKDEN, G.; RAY, P.; SLEENMAN, P.; ANGELINI, G.D.; MURPHY, G.J. Interactions of cardiopulmonary bypass and erythrocyte transfusion in the pathogenesis of pulmonary dysfunction in swine. **Anesthesiology**, v.119, n.2, p.365-378, 2013.

PEÑUELA, O.A. Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. **Colombia Médica**, v.36, n. 3, p.215-225, 2005.

RAZOUK, F.H.; REICHE, E.M.V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.26, n.2, p.126-134, 2004.

SCHMIDT, P.J., LEACOCK, A.G. Forgotten transfusion history: John Leacock of Barbados. **British Medical Journal**, v. 325, n.7378, p.1485-1487, 2002.

SCHNEIDER, A. Blood components: collection, processing and storage. **Veterinary Clinics of North América: Small Animal Practice**, v.25, n. 6, p.1245-1261, 1995.

SCOTT, K.L.; LECAK, J.; ACKER, J.P. Biopreservation of blood cells: past, present and future. **Transfusion Medicine Review**, v.19, n.2, p.127-142, 2005.

SOUSA, R.S.; A. BARRÊTO-JÚNIOR, R.A.; SOUSA, I.K.; CHAVES, D.F.; SOARES, H.S.; BARROS, I.O.; MINERVINO, A.H.; ORTOLANI, E.L. Evaluation of hematologic, blood gas, and select biochemical variables in ovine whole blood stored in CPDA-1 bags. **Veterinary Clinical Pathology**, v.42, n.1, p.27-30, 2013.

SOUSA, R.S.; BARROS, I.O.; TAVARES, M.D.; SOUSA, I.K.F.; OLIVEIRA, G.B.; MINERVINO, A.H.H.; BARRETO JUNIOR, R.A. Lesões de armazenamento durante a conservação de sangue nas diferentes espécies: uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n. 2, p.68-79, 2012.

SPEAKE, P.F.; ROBERTS, C.A.; GIBSON, J.S. Effect of changes in respiratory blood parameters on equine red blood cell K-Cl cotransporter. **American Journal of Physiology**, v. 273, n.6, p.1811-1818, 1997.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.729.

TAVARES M.D.; BARROS, I.O.; SOUSA, R.S.; FIRMINO, P.R.; REGO, R.O.; GAMELEIRA, J.S.; SOUZA, F.J.A.; NUNES, T.L.; MINERVINO, A.H.H.; BARRETO JUNIOR, R.A. Avaliação hemogasométrica de sangue total asinino (equus asinus) armazenado em bolsas CPDA-1. In: 38º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2011, Florianópolis. Anais do 38º Congresso brasileiro de medicina veterinária, 2011.

TOMLINSON, J.E.; TABERNER, E.; BOSTON, R.C. OWENS, S.D.; NOLEN-WALSTON, R.D. Survival time of cross-match incompatible red blood cells in adult horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.29, n.6, p.1683-1688, 2015.

WARDROP, K.J.; TUCKER, R.L.; MUGNAI, K. Evaluation of Canine Red Blood Cells Stored in a Saline, Adenine, and Glucose Solution for 35 Days. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.11, n. 1, p.5-8, 1997.

WARDROP, K.J.; YOUNG, J.; WILSON, E. Na in vitro evaluation of storage media for the preservation of canine packed red blood cells. **Veterinary Clinical Pathology**, v.23, n.3, p. 83-88, 1994.

WISE, L.N.; KAPPEMEYER, L.S.; MEALEY, R.H. Review of equine piroplasmiasis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.27, n. 6, p.1334-1346, 2013.

YOSHIDA, T.; SHEVKOPLYAS, S.S. Anaerobic storage of red blood cells. **Blood Transfusion**, v.8, n.4, p.220-236, 2010.

ZUBAIR, A.C. Clinical impact of blood storage lesions. **American Journal of Hematology**, v.85, n.2, p.117-122, 2010.

ANEXOS

Anexo 1: Ficha resumida dos exames clínicos para a seleção dos cavalos doadores para o experimento. Observação: Animais destacados em amarelo foram os descartados do experimento.

| ANIMAL | SEXO | IDADE | RAÇA | ESTADO NUTRICIONAL (score) | PESO (kg) | FC | FR |
|-------------|------|-------|-------|----------------------------|-----------|----|----|
| BABALU | F | 2002 | BH | 3 | 400 | 28 | 16 |
| LEDA* | F | 2000 | SRD | 3 | 460 | 48 | 28 |
| DIAMANTE | MC | 2005 | PSL | 4 | 470 | 46 | 20 |
| GAZELA | F | 2010 | PSL | 4 | 530 | 34 | 20 |
| FURACÃO | MC | 2009 | PSL | 4 | 515 | 46 | 25 |
| GAMELA | F | 2010 | PSL | 4 | 485 | 36 | 24 |
| TEQUILA* | F | 2002 | ÁRABE | 2 | 415 | 52 | 18 |
| GRACIOSA | F | 2010 | PSL | 4 | 490 | 46 | 24 |
| GATINHA** | F | 2005 | SRD | 2 | 410 | 32 | 18 |
| PANDORA | F | 2001 | PSL | 3 | 405 | 45 | 15 |
| FALCÃO | MC | 2009 | PSL | 4 | 450 | 42 | 18 |
| FÉNIX | MC | 2009 | PSL | 4 | 480 | 48 | 24 |
| MATRIZ** | F | 2002 | BH | 2,5 | 415 | 46 | 27 |
| MORANGUINHA | F | 2014 | SRD | 4 | 440 | 58 | 25 |
| TORNADO | MI | 2012 | PSL | 4 | 450 | 60 | 25 |

Fonte: COSTA (2018).

*Amamentando

**Score <3

Legenda: F= Fêmea. MC= Macho castrado. MI= Macho inteiro. BH= Brasileiro de Hipismo. SRD= Sem Raça Definida. PSL= Puro Sangue Lusitano. FC= Frequência Cardíaca. FR= Frequência Respiratória.

ANEXO 2

Anexo 2: Quadro resumido dos exames laboratoriais para a seleção dos cavalos doadores para o experimento. Observação: Animais destacados em amarelo foram os descartados do experimento.

| | BABALU | LEDA | DIAMANTE | GAZELA | FURACÃO | GAMELA | TEQUILA | GRACIOSA | GATINHA | PANDORA | FALCÃO | FÉNIX | MATRIZ | MORANGUINHO | TORNADO |
|--|--------|------|----------|--------|---------|--------|---------|----------|---------|---------|--------|-------|--------|-------------|---------|
| He (x10⁶) | 7,14 | 9,14 | 9,15 | 8,11 | 6,86 | 8,78 | 8,07 | 7,68 | 6,07 | 7,49 | 8,07 | 9,05 | 7,34 | 9,02 | 9,39 |
| Hg (g/dL) | 11,8 | 13,8 | 15,1 | 12,1 | 10,5 | 13,5 | 12,9 | 11,9 | 10,3 | 12,7 | 12 | 13,2 | 11,5 | 13,9 | 13,1 |
| VG (%) | 33 | 43 | 41 | 35 | 29 | 38 | 37 | 35 | 32 | 35 | 33 | 38 | 32 | 39 | 38 |
| VCM (fL) | 49 | 46,2 | 49,2 | 46,9 | 46,4 | 46 | 47,1 | 46,7 | 47,6 | 48,7 | 46,1 | 44,3 | 45,6 | 45,8 | 42,8 |
| CHCM (g/dL) | 33,7 | 32,7 | 33,6 | 31,8 | 33 | 33,4 | 33,9 | 33,1 | 35,6 | 34,8 | 32,3 | 32,9 | 34,3 | 33,7 | 32,6 |
| RDW (%) | 18,9 | 17,2 | 18,1 | 17,7 | 18,5 | 17,4 | 17,8 | 18,1 | 17,3 | 17,7 | 18,6 | 19,8 | 21,2 | 17,7 | 20,3 |
| Leucócitos Totais (x10³) | 8,5 | 8,3 | 7,8 | 7,8 | 7,2 | 7,3 | 12,3 | 6,5 | 10,2 | 10,3 | 7,4 | 8,4 | 6,7 | 9,6 | 8,3 |
| Neutrófilo segmentado | 4335 | 4897 | 5304 | 3978 | 4896 | 3650 | 7257 | 3575 | 7242 | 5665 | 5328 | 4116 | 4087 | 4128 | 3735 |
| Linfócitos | 3995 | 2988 | 2418 | 3666 | 2160 | 3504 | 4059 | 2795 | 2754 | 3811 | 1702 | 4200 | 2077 | 5376 | 4316 |
| Eosinófilos | 170 | 83 | 0 | 78 | 72 | 0 | 861 | 65 | 0 | 103 | 148 | 0 | 335 | 0 | 249 |
| Monócitos | 0 | 332 | 78 | 78 | 72 | 146 | 123 | 65 | 204 | 721 | 222 | 84 | 201 | 96 | 0 |
| Plaquetas (x10³) | 156 | 168 | 142 | 258 | 171 | 149 | 153 | 216 | 177 | 130 | 219 | 201 | 174 | 159 | 180 |
| PT (g/dL) | 6 | 6,4 | 6 | 5,4 | 6 | 6,2 | 6 | 6 | 6,6 | 7 | 6,4 | 6,4 | 5,8 | 6,4 | 6,4 |

Fonte: COSTA (2018).

Observação: Destaque em azul para o Volume globular (VG) do animal Furacão que se encontra abaixo do valor de referência preconizado por Weiss e Wardrop (2010).